Aus dem Physiologischen Institut,
Lehrstuhl für Klinische Physiologie
(Direktor: Prof.Dr. R. Kaufmann)
der Universität Düsseldorf

ENTWICKLUNGSLEISTUNGEN VON ZELLEN AUS DEM HERZEN NEUGEBORENER RATTEN BEI KULTUR AUF SUSPENDIERTEN TRÄGERN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Ursula Stoffels

1984

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan der
Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.:
Prof. Dr. A. Hopf

Referent
gez.: Prof. Dr.Jörg G. Moser

Korreferent
gez.: Prof.Dr. H. Bojar

M e i n e n E l t e r n

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung 1

Einleitung 2

Material und Methoden 5

Ergebnisse 9

I. Zellzüchtung auf Mikrocarriern

I.1 Präparation der Zellen 9

I.2 Mikrocarrier 17

I.3 Bewuchskinetik von Herzzellen auf Mikrocarriern 19

I.3.1. Cytodex 3 20

I.3.2 Cytodex 1 21

II. Entwicklung von Herzzellen und Herzzellfraktionen auf Mikrocarriern

II.1 Mitoseaktivität 25

II.2 Spontane kontraktile Aktivität 27

II.3 Verbesserung der Registriertechnik durch Inkorporation von Cytodex 3 in Zellmonolayer 28

II.4 Wuchsformen von Zellaggregaten zwischen Cytodexpartikeln und in der stationären Kultur 30

II.5 Myoblastenzucht unter Dexamethason 33

II.6 Gerichtete Kontraktion und Ausbildung von Muskelfasern in Gegenwart von Cytodex 3 34

II.7. Darstellung von Myofibrillen und desmosomalen Proteinen durch Immunfluoreszenz 35

III. Zelluläre und subzelluläre Organisation von Myoblasten-Reaggregaten nach Kultur auf Cytodex 3 - Mikrocarriern

III.1 Zellulärer Aufbau der Reaggregate 37

III.2 Cytoplasmatische Organellenausstattung 40

III.3 Differenzierungen des Plasmalemms 42

Diskussion 45

Abbildungsteil (Abb. 2 - 35) 55

Literaturverzeichnis 101

Herrn Prof.Dr. Jörg G. Moser möchte ich herzlich für die Vergabe des Themas,viele Anregungen und die gute Zusammenarbeit danken.
Herr Prof.Dr. Raimund Kaufmann stellte mir dankenswerterweise einen Arbeitsplatz zur Verfügung.
An der Herstellung der elektronenmikroskopischen Präparate und Durchführung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen war Herr Dr. Friedrich Kopp vom Diabetesforschungsinstitut der Universität Düsseldorf ganz wesentlich beteiligt.
Ein Großteil der fluoreszeszenzimmunologischen Untersuchungen wurde am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg mit Herrn Dr. Jürgen Kartenbeck durchgeführt.
Die in dieser Arbeit untersuchten Microcarrier stellten die Firmen Pharmacia (Dr. Julian Clark),Nunc und Biorad zur Verfügung.
Mir als Anfängerin half Frau Gill Muncke mit Ratschlägen und praktischen Tips bei der Erlernung der Zellzüchtung.
Frau Felicia Goldenberg sei gedankt für technische Vorbereitungen und vor allem für ihre Aufheiterung während langwieriger Experimente.
Herrn Günter Gördes möchte ich danken für Entwurf und Herstellung von elektronischen Apparaturen.
Mein Dank gilt auch Frau Sybille Holzmann,Frau Sylvia Berger und Frau Nina Bühring für ihre Mühen bei der Anfertigung des Manuskripts,der Graphiken und der Entwicklung zahlreicher Photoserien.
Frau Sükran Can sorgte dafür,daß alle für meine Versuche notwendigen Glasgefäße und sonstiges Instrumentarium stets in einwandfreiem Zustand waren.
Nicht zuletzt ein herzliches Dankeschön an Heinrich und Susanne Moser,die mir in ihren Sommerferien wiederholt bei der Auswertung von Zellzählungen halfen.

Die Arbeit wurde aus Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 30, Kardiologie, Projekt D 4/S 5) und aus Mitteln des Ministers für Wissenschaft und Forschung Nordrhein-Westfalen (II B 5 - FA 6295) gefördert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde publiziert:

Kartenbeck,J., Franke, W.W., Moser, J.G., Stoffels, U.:

Specific attachment of desmin filaments to desmosomal plaques in cardiac myocytes.

EMBO J. 2, 735-742 (1983)

Teile dieser Arbeit sind zur Publikation eingereicht:

Moser,J.G., Stoffels,U., Straschewski,J.,Kartenbeck,J:

Buoyant density, efficient purification, and organotypic development of myoblasts from neonatal rat heart.

Europ.J.Cell Biol. (eingereicht)

Moser,J.G., Stoffels U.:

Differentiation of heart cells from newborn rats on Cytodex^{TM}1 microcarriers.

Europ.J.Appl.Mikrobiol.Biotechnol. (eingereicht)

Zusammenfassung

Untersucht wurde die Entwicklung von Herzzellkulturen auf Mikrocarriern in Suspensionen. Von 5 verschiedenen kommerziell angebotenen Mikrocarriern erwiesen sich nur 3 (Biosilon, Cytodex 1 und Cytodex 3) als geeignet für die Zucht von Herzzellen und Herzmyoblasten. Im Einzelnen wurde der Verlauf der Kultur für den Mikrocarrier Cytodex 1 quantitativ verfolgt. Dabei konnten Bedingungen für ein Standardverfahren ausgearbeitet werden, ebenso ein verbessertes Verfahren für die enzymatische Disaggregation von Herzzellen, wobei deren Weiterzucht nur nach Elution cytotoxischer Substanzen aus den Mikrocarriern gelingt.

Die Bildung von Myozyten-Reaggregaten standardisierter Größe aus Monolayern auf dem Mikrocarrier Cytodex 3 veranlasste eine funktionsmorphologisch - elektronenmikroskopische Untersuchung dieses häufig in der Literatur untersuchten Herzmodells. Trotz einer von der Monolayerkultur vielfach abweichenden Grobmorphologie zeigten Zellen aus Myoblasten-Reaggregaten fast durchwegs alle Eigenschaften von Muskelzellen, was auch fluoreszenzimmunologisch bestätigt werden konnte. Dazu fanden wir interessanterweise einen funktionsmäßig vermutlich wichtigen Gradienten der Membrandifferenzierung, insbesondere des T-Tubulus, von der Außenseite ins Innere der Aggregate: echte T-Tubuli finden sich nur in den innersten Zellen, wobei die Orientierung senkrecht, nicht quer zur Myofibrille erfolgt. Die äußeren Zellen zeigen als Äquivalent paarige Dyadenstrukturen, die dann auch in Monolayerkulturen aufgefunden werden konnten.

E i n l e i t u n g

Die Kultur von substratabhängigen Zellen in Suspension ist durch die Arbeiten der Gruppe um A.L. van Wezel (68,69) erstmals möglich geworden. In einer Reihe von Publikationen wurde gezeigt, daß auf einer mit geringen Mengen von Diäthyl-Amino-Äthylgruppen (DEAE) substituierten Dextran-Matrix von geringer Korngröße (ø 200 µm) und einer dem Kulturmedium nahezu gleichen Dichte (d = 1.05) substratabhängige Zellinien unter ähnlichen Bedingungen wie auf stationärem Trägermaterial oder in Rollerkulturen gezüchtet werden können (8,44,74).

Inzwischen ist diese Technik mehrfach modifiziert worden. Einerseits hat sich gezeigt, daß auch kugelförmige Träger aus Polystyrol, Polyacrylamid oder Methacrylat-Hydrogelen für derartige Suspensionskulturen verwendet werden können; andererseits wird eine Oberflächenladung an derartigen "Mikrocarriern" in vielen Fällen überflüssig, wenn deren Oberfläche mit nativem oder denaturiertem Collagen als Haftsubstrat für Fibronectin covalent gekoppelt wird. Clark (8) nennt in einer Zusammenfassung von 1982 rund 120 Zellarten, die im wesentlichen auf dem Anionenaustauscher Cytodex^{R} 1 gezüchtet worden sind. Für collagenbeschichtete Dextrane existieren bisher nur wenige Literaturangaben, die ebenfalls von Clark (6,7) referiert worden sind. Über die Zucht von Zellinien auf Polystyrol, Polyacrylamid und Methacrylat gibt es nur wenig umfangreiche Listen der Hersteller Nunc und Biorad, die für den Zweck dieser Arbeit aber auch nur von untergeordneter Bedeutung sind (4,39,72).

Alle genannten Darstellungen nennen nur eine Arbeit, in der versucht wurde, Muskelzellen auf suspendierten Trägern zu züchten (52). Dabei konnte für Skelettmuskelzellen von Ratte und Hühnchen gezeigt werden, daß diese Zellen auf suspendierten Trägern sich anheften und - im Falle der Hühnchen-Myoblasten - fusionieren und sich zu Muskelfasern weiterentwickeln. Weitere Untersuchungen zur physiologischen und biochemischen Entwicklung dieser Zellen stehen wohl noch aus.

Herzmuskelzellen sind - ebenso wie Skelettmuskelzellen- substratabhängig. Ihre Kultur gelingt auf den verschiedensten Plastikoberflächen sowie auf collagenbeschichteten Glasträgern (15,17,18,51,52,59,65,73).

Herzzellkulturen in Suspension ohne Zugabe von Microcarriern sind mehrfach erfolgreich versucht worden (z.B. 25,45,65). Hierbei entstehen kleine Zellaggregate aus 5o - 3oo Zellen, die sich bereits in der Suspensionskultur soweit entwickeln, daß man unmittelbar nach der Explantation in Kulturgefäße ihre Kontraktionsaktivität beobachten kann,die sich im Laufe einiger Tage nach Festsetzen der Zellen am Kulturgefäß verstärkt.Sperelakis und seine Arbeitsgruppe (36,57,65) bezeichnen diese Zellhaufen als "Reaggregate",offenbar in der Annahme,daß während der Vorkulturperiode keine wesentliche Zellvermehrung stattfindet,die Substratabhängigkeit jedoch ein gegenseitiges Anheften und Verklumpen der Zellen bedingt.

Die Zellreaggregate bestehen aus mehreren Zellschichten; dies erklärt vielleicht ihre außerordentlich konstante spontane Kontraktionsaktivität.Nach den Befunden von Sperelakis (65) und von Renaud et al. (57) entwickeln sie eine Ausstattung an Neurotransmitter - Rezeptoren,die der

des Herzens neugeborener Ratten und Hühnchen ähnlich ist (5). Deswegen ist dieses Zellmodell physiologisch häufig untersucht worden. Die morphologische Organisation der Zellreaggregate ist bisher nie ausreichend beschrieben worden; elektronenmikroskopische Befunde existieren bisher nur für Herzzellmonolayer und primäre Zellsuspensionen, die unter der Einwirkung verschiedener enzymatischer Disaggregationsverfahren gewonnen wurden (9,14,30,40,43,53,70;vgl. S.37)

Die Mehrschichtigkeit von Herzzellreaggregaten bedingt Diffusionsbarrieren, die gegenüber echten Monolayerkulturen sich für Untersuchungen über die Kinetik von Ionenströmen oder über den Zeitverlauf des Wirkungseintritts von Neurotransmittern und Pharmaka verfälschend auswirken müssen. Andererseits weisen kleine Monolayerkulturen selbst der gleichen Zellcharge vielfach so erhebliche Unterschiede in der Zusammensetzung der Zellpopulation und in der Zelldichte auf, daß biochemisch reproduzierbare Ergebnisse schwer zu erhalten und Ionenfluxmessungen mit großen Fehlern behaftet sind (34,41,61).

Z i e l d i e s e r A r b e i t ist es,die hier geschilderten Nachteile beider Kulturverfahren durch eine Kultur von Herzzellen auf suspendierten Trägern zu umgehen und dadurch zu einer pipettierbaren Zellsuspension unter sehr homogenen Kulturbedingungen (O_2 - Versorgung, pH - Konstanz,Temperaturkonstanz,Nährstoffversorgung) zu gelangen.Dabei konnten Bedingungen gefunden werden,unter denen aus Zellmonolayern auf Mikrocarriern Zellreaggregate definierter Größe entstanden,wie im zweiten Teil dieser Arbeit geschildert.Diese Reaggregate konnten in ihrer Organisation elektronenmikroskopisch untersucht werden.

Material und Methoden

Alle Lösungen wurden, wo nicht anders vermerkt, aus analysenreinen Chemikalien der Firma Merck (Darmstadt) unter Verwendung von quarz-bidestilliertem Wasser hergestellt. Das Medium Waymouth MB 752/1 wurde von Flow Laboratories (Bonn) bezogen, das Medium Ham's F 12 sowie Pferdeserum und Trypsin (1:250, 2.5%) von Boehringer (Mannheim). DNAse I und eine Silikonflüssigkeit zum Silikonisieren aller in der Zellkultur benutzten Glaswaren stammten von Serva (Heidelberg). Antibiotika, sofern sie überhaupt benutzt wurden, waren Penicillin (Grünenthal) und Streptomycin (Squibb). Dexamethason war ein Produkt von Sigma (München); Adriamycin wurde unter der Bezeichnung Adriblastin™ von Pharmitalia bezogen. Percoll™ zur Bereitung von Dichtegradienten wurde von Pharmacia (Uppsala, Schweden) erhalten. Über Herkunft und Eigenschaften der hier geprüften Mikrocarrier gibt Tab.8 im Ergebnisteil Auskunft. Ebenso wird die Präparation der Herzzellen ausführlich im 1. Teil der Ergebnisse erörtert. Die Präparation von Myoblasten aus dem Zellgemisch erfolgte nach einer hier im Hause erarbeiteten Methodik (27,47).

Die Zucht der Zellen erfolgte in der Rührkultur in Kulturgefäßen der Fa. Bellco (Nr. 1961-00250 oder 1966-00150) mit kontinuierlichem Rühren oder mit diskontinuierlichen Rührprogrammen, die über eine Sekunden-Zeitschaltuhr eigener Bauart gesteuert wurden. Zuchttemperatur war 35°C, wobei der pH über einen CO_2-Titrator kontinuierlich auf 7.35 gehalten wurde. Für die Aussaat der Zellen im Anschluß an die Vorkulturperiode wurden 24-well plates der Firmen Nunc oder Costar mit eingelegten collagenbeschichteten 10 x 10 mm Deckgläsern verwendet. Mediumwechsel erfolgte in den ersten 4 Tagen täglich, später alle 2 Tage.

Die kontraktile Aktivität der Zellen wurde unter kontinuierlicher Überströmung mit dem Kulturmedium, zuweilen unter Erhöhung der Ca^{++} - Konzentration auf 1.5 mM, mit einem dynamischen Cytophotometer entsprechend Abb. 1 registriert.

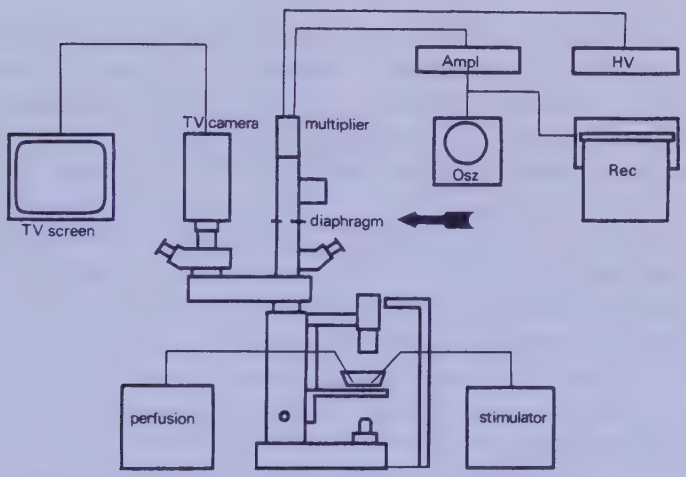


Abb. 1: Blockbild der Registriereinrichtung zur dynamischen Cytophotometrie an Herzzellen (nach Wittmann (71) modifiziert).

Das Superfusionsvolumen wurde so eingestellt, daß ein 10facher Mediumwechsel pro Minute erfolgte. Das Medium wurde über einen CO_2-Autotitrator auf pH 7.35 $\pm$ 0.01 vor der Superfusion eingestellt. Im Versuchsgefäß selbst wurde die Temperatur über einen

Thermistor gemessen. Schwankungen um die übliche Versuchstemperatur von 32°C blieben im Bereich von ± 0.2°C. Zur elektrischen Reizung der Zellen waren Platin-Feldelektroden in das Versuchsbad eingebracht, die mit einer Eingangsspannung von 7-10 V bei Reizimpulsen von 2-10 msec Dauer betrieben wurden (Reizgerät HSE, Hugstetten b. Freiburg). Das benutzte Umkehrmikroskop war ein Diavert (Leitz, Wetzlar) mit Objektiven 10x und 32x. Das Gerät basiert auf Arbeiten von Kaufmann et al. (28).

Fluoreszenztechniken wurden mit der Orthoplan-Orthomat-Kombination (Leitz, Wetzlar) ausgeführt. Die Adriamycinincorporation an Muskelkernen entsprach dem Verfahren von Lampidis et al. (35,58). Immunfluoreszenztechniken sind publiziert (12, 27). Antikörper gegen Desmin und die Desmoplakine entsprechen denen von Franke et al. (12) und Kartenbeck et al. (27). Ein anti-Myosin (schwere Kette) wurde auf Wistar II-Ratten mit Frosch-Skelettmuskel-Myosin als Immunogen erhalten. Dieser Antikörper zeigt starke Kreuzreaktionen mit Herzmuskelmyofibrillen vom Rind, von der Ratte und vom Menschen, ganz entsprechend den Ergebnissen von Hirabayashi und Hayashi (19,20). Das Ratten-Ascites-System, das bei der Bereitung dieses Antikörpers verwendet wurde, ist publiziert (2, 50).

Für die Elektronenmikroskopie wurden die Zellen auf der Glasunterlage mit 1% Glutaraldehyd in 0.1 M Kakodylatpuffer pH 7.2 fixiert, nach kurzer Spülung im Puffer mit 1% wässrigem Osmiumtetroxyd nachfixiert und bis zu 70% Äthanol geführt. Hier erfolgte Blockkontrastierung mit 1% Uranylacetat in 70% Äthanol über Nacht, dann Weiterführung der Präparate bis zu 100% Äthanol und Einbettung in Epon über mehrere Mischungsstufen. Schnitte einer Dicke von etwa 50 nm wurden in 3 Serien auf dem Siemens EM 102 bei 9000-30000facher Primärvergrößerung dokumentiert. Einzelstrukturen wurden auch bei 100000facher Vergrößerung photographiert.

Zellzählungen wurden entweder an unfixiertem Material direkt im Phasenkontrastmikroskop ausgeführt oder besser nach Fixierung der Zellen mit 0.1% Gentianaviolett in Essigsäure. Allerdings bestand hier die Gefahr, daß kleine mitotische Zellen mit geringer Haftfestigkeit von den Mikrocarriern abgespült wurden.

Ergebnisse

I. ZELLZÜCHTUNG AUF MIKROCARRIERN

I.1 Präparation der Zellen

Die Präparation einer Gesamtzellsuspension aus Rattenherzen ging aus von einem Vorschlag von J. Paul (51) für die Präparation von Nierenzellen, bei dem Nierengewebe zunächst über Nacht in eiskaltem Trypsin inkubiert wird, um dem Enzym ein Eindringen in die Interzellulärräume zu gestatten und später die Zellen mit Gemischen von Trypsin und DNA'se oder alternierend mit diesen Enzymen zu disaggregieren. Dieser Vorschlag wurde später von Edelman und Rutishauser (11) auch für die Präparation von Lymphozyten insofern aufgenommen, als diese Autoren langsträngige DNA, die bei der Lyse kernhaltiger Blutzellen auftritt und zu einer Verklumpung der Zellen führt, durch DNA'se zu spalten versuchten (11).

Das Prinzip der Disaggregation von Rattenherzen zu Gesamtzellsuspensionen zeigt Tabelle 1. Im Verlaufe dieser Arbeit wurde dieses Verfahrensprinzip jedoch mehrfach modifiziert und optimiert, wobei gegenüber früheren Verfahren mit einer Zellausbeute zwischen 8.3 und 9.4 x 10^5 Zellen/Herz schließlich regelmäßig eine Gesamtausbeute von 4.8 - 5.2 x 10^6 Zellen/Herz erreicht wurde (siehe Tabelle 3 - 6). Tabelle 7 gibt eine Übersicht über die mit den einzelnen Modifikationen des Grundverfahrens erhaltenen Ausbeuten.

Zusätzlich gelang es im Rahmen der Doktorarbeit meines Kollegen Straschewski, durch isopyknische Dichtegradientenzentrifugation an Percoll, Myoblasten von Nichtmuskelzellen sauber zu trennen, so daß besonders für die im zweiten Teil der Ergebnisse geschilderten Versuche reine Myoblastensuspensionen (20 - 30% der Gesamtzellzahl) zur Verfügung standen (Tab. 2).

Tabelle 1

Prinzip der Zellpräparation

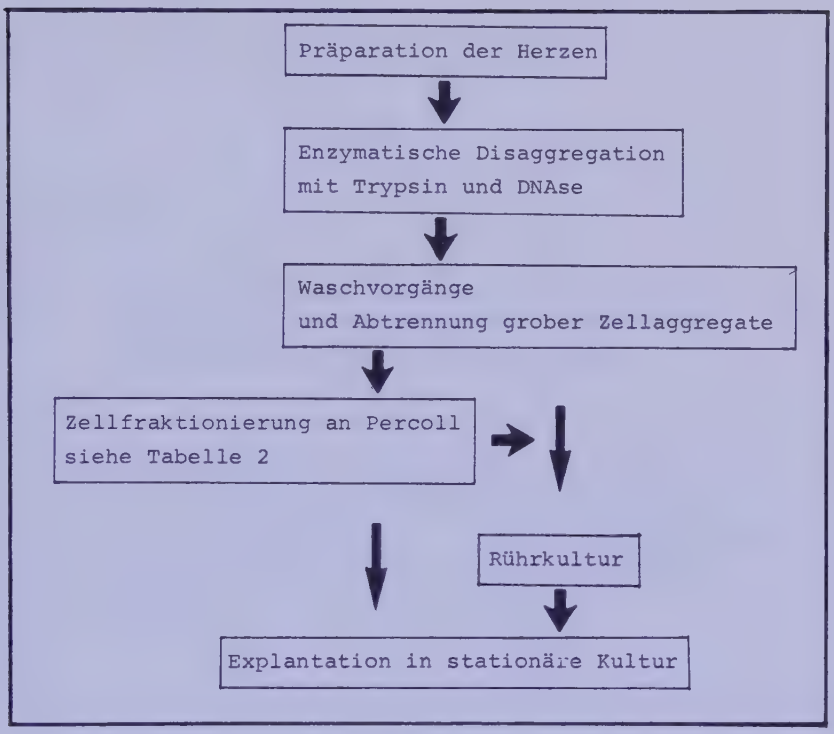


Tabelle 2

Zellfraktionierung durch isopyknische Dichtegradienten-zentrifugation an Percoll

	isopyknische Dichte bei 20°C
Fibroblasten und Nichtmuskelzellen	◀1.o3
Myoblasten	1.o62 - 1.o79
Erythrocyten	▶1.12

Tabellen 3-6

Verschiedene Verfahren zur Präparation von Herzzellen und Herzmuskelzellen, die im Verlaufe dieser Arbeit benutzt wurden.

Die enzymatische Disaggregation der Zellen wurde mit den angegebenen Verdünnungen von Trypsin (Boehringer, Mannheim; 1 : 250, 2.5 %) und immer mit einer DNAse-Konzentration von 1 mg/ml ausgeführt.

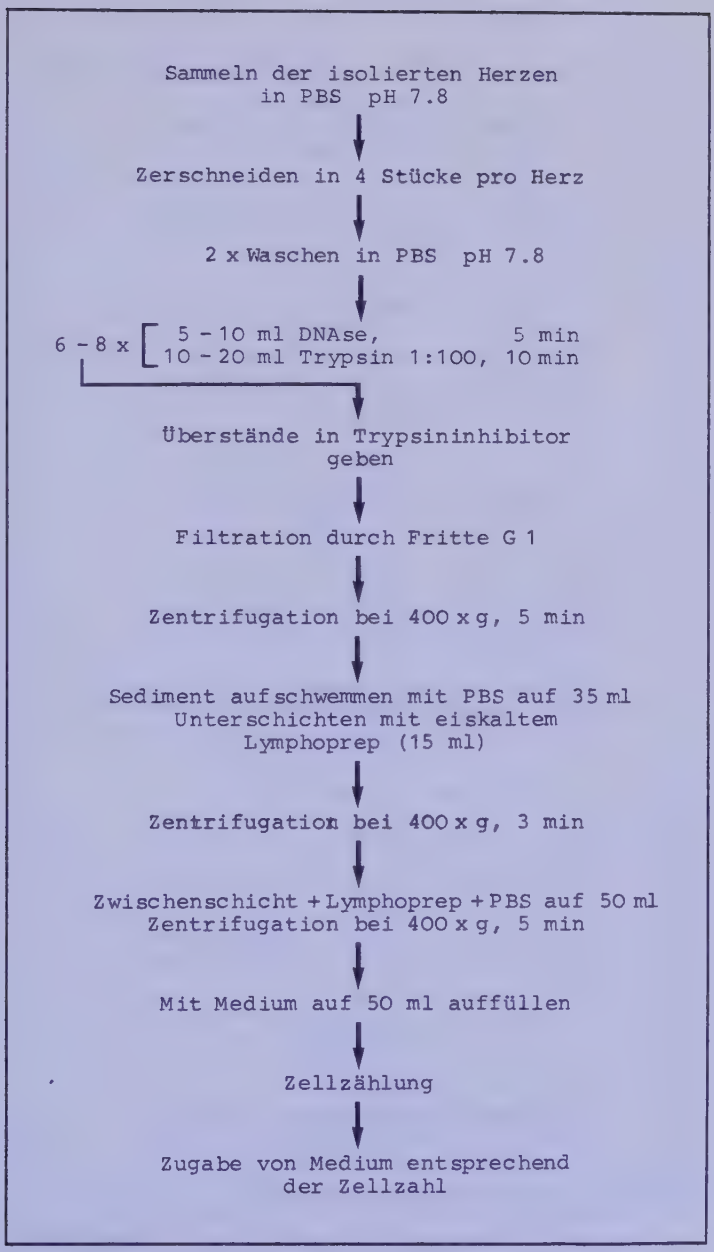

Sammeln der isolierten Herzen
in PBS pH 7.8
Zerschneiden in 4 Stücke pro Herz
2 x Waschen in PBS pH 7.8
6 - 8 x
5 - 10 ml DNAse, 5 min
10 - 20 ml Trypsin 1:100, 10 min
Überstände in Trypsininhibitor
geben
Filtration durch Fritte G 1
Zentrifugation bei 400 x g, 5 min
Sediment aufschwemmen mit PBS auf 35 ml
Unterschichten mit eiskaltem
Lymphoprep (15 ml)
Zentrifugation bei 400 x g, 3 min
Zwischenschicht + Lymphoprep + PBS auf 50 ml
Zentrifugation bei 400 x g, 5 min
Mit Medium auf 50 ml auffüllen
Zellzählung
Zugabe von Medium entsprechend
der Zellzahl

Tabelle 3

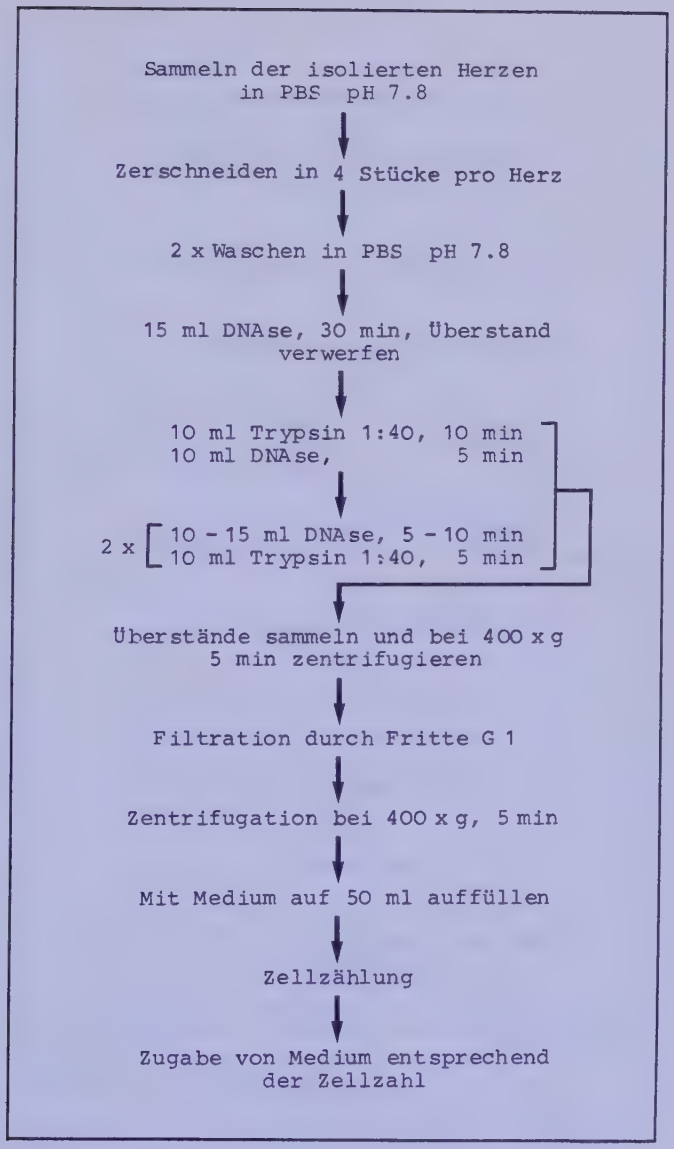

Sammeln der isolierten Herzen
in PBS pH 7.8
Zerschneiden in 4 Stücke pro Herz
2 x Waschen in PBS pH 7.8
15 ml DNAse, 30 min, Überstand
verwerfen
10 ml Trypsin 1:40, 10 min
10 ml DNAse, 5 min
2 x
10 - 15 ml DNAse, 5 - 10 min
10 ml Trypsin 1:40, 5 min
Überstände sammeln und bei 400 x g
5 min zentrifugieren
Filtration durch Fritte G 1
Zentrifugation bei 400 x g, 5 min
Mit Medium auf 50 ml auffüllen
Zellzählung
Zugabe von Medium entsprechend
der Zellzahl

Tabelle 4

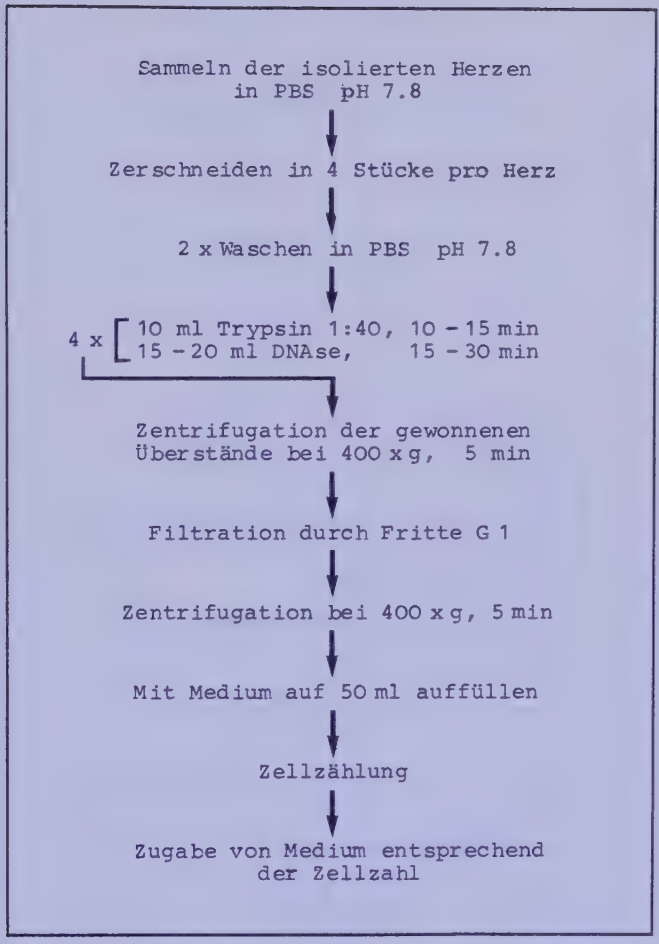

Sammeln der isolierten Herzen
in PBS pH 7.8
Zerschneiden in 4 Stücke pro Herz
2 x Waschen in PBS pH 7.8
4 x [10 ml Trypsin 1:40, 10 - 15 min
15 - 20 ml DNAse, 15 - 30 min
Zentrifugation der gewonnenen
Überstände bei 400 x g, 5 min
Filtration durch Fritte G 1
Zentrifugation bei 400 x g, 5 min
Mit Medium auf 50 ml auffüllen
Zellzählung
Zugabe von Medium entsprechend
der Zellzahl

Tabelle 5

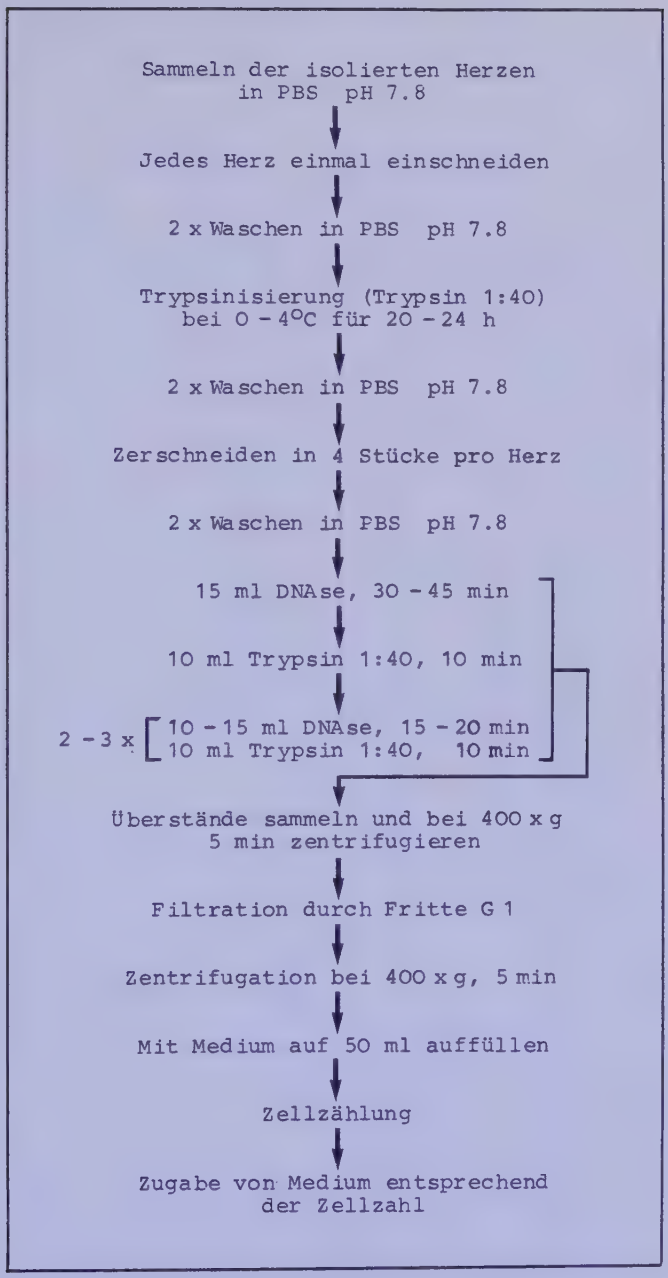

Sammeln der isolierten Herzen
in PBS pH 7.8
Jedes Herz einmal einschneiden
2 x Waschen in PBS pH 7.8
Trypsinisierung (Trypsin 1:40)
bei 0 - 4°C für 20 - 24 h
2 x Waschen in PBS pH 7.8
Zerschneiden in 4 Stücke pro Herz
2 x Waschen in PBS pH 7.8
15 ml DNAse, 30 - 45 min
10 ml Trypsin 1:40, 10 min
2 - 3 x
10 - 15 ml DNAse, 15 - 20 min
10 ml Trypsin 1:40, 10 min
Überstände sammeln und bei 400 x g
5 min zentrifugieren
Filtration durch Fritte G 1
Zentrifugation bei 400 x g, 5 min
Mit Medium auf 50 ml auffüllen
Zellzählung
Zugabe von Medium entsprechend
der Zellzahl

Tabelle 6

Tabelle 7 . Ausbeuten an Herzzellen und Herzmuskelzellen nach den Verfahren der Tabellen 3 - 6

Verfahren Tabelle	3	4	5	6
Zahl der Versuche	20	11	2	18
Zellen pro Herz (Mio)	3.0-4.7	3.3-4.7	3.0/3.7	2.3-5.7
Zahl der Versuche				8
Myoblasten pro Herz (Zellzählung am COULTER-Counter)				1.1-4.8

I.2 Mikrocarrier

Zur Verfügung standen 5 verschiedene Suspensionsträgermaterialien, im Folgenden als "Mikrocarrier" bezeichnet (Tab. 8). Nach Vorschrift aller Hersteller waren diese Partikel lediglich zweimal mit phosphatgepufferter Saline (PBS) zu spülen, mit dem Kulturmedium zu äquilibrieren und dann für die Kultur verschiedenster Primärzellen und Zellstämme verwendbar (72).

Wir versuchten zunächst, ein Zellgemisch, das durch Trypsinisierung von Rattenherzen bereitet worden war, nach dieser Vorschrift auf den fünf verschiedenen Mikrocarriern zu kultivieren. Hierbei wurde so verfahren, daß einer Suspension von 5×10^5 Zellen/ml die in der Tabelle 9 angegebenen Wachstumsflächen sowohl bei einem intermittierenden Rührprogramm (1 Minute Rühren, 14 Minuten Ruhe) als auch bei kontinuierlichem Rühren (60 U/Minute) jeweils in dem silikonisierten Rührkulturgefäß der Bellco Glass Inc. Typ 1961-00250 angeboten wurden.

Unter allen genannten Bedingungen gelang es in keinem Falle, eine Anheftung der Zellen an die Mikrocarrier zu erreichen. Wenn wir die Zellen nach 2 Tagen mitsamt den Mikrocarriern in stationäre Kulturen explantierten (wobei in der Regel das bewährte Falcon-Gefäß 3308 (25 cm^2 Wachstumsfläche) verwendet wurde), war nur ein geringer Anteil der Zellen überhaupt in der Lage, sich am Gefäßboden festzusetzen. Alle Zellen zeigten toxisch bedingte Schäden, insbesondere eine grobe Vakuolisierung;spontane Kontraktionsaktivität konnte nur ganz selten beobachtet werden.

Die zytotoxischen Effekte waren keinesfalls Infektionen der Trägermaterialien zuzuschreiben,was mehrfach durch das Institut für Mikrobiologie der Universität Düsseldorf

Tabelle 8 Eigenschaften der verwendeten Mikrocarrier

Ein Teil der Angaben konnte Broschüren der Hersteller entnommen werden, weitere wurden näherungsweise berechnet.

T y p	Partikel-durchmesser (/um)	Wuchsfläche (cm^2/ g Trocken-gewicht)	Zahl derTräger pro g Trocken-gewicht x 10^6	Dichte in O.9% NaCl	Quellung (ml/ g Trocken-gewicht)
Cytodex 1	180	6 000	6.8	1.03	18
Cytodex 2	155	5 500	5.8	1.04	15
Cytodex 3	175	4 600	4.0	1.04	14
Biosilon	160 - 300	260	.94	1.05	1
Biocarriers	150	820	7.0	1.04	13

(Prof. Rosin) überprüft wurde. Es mußte sich demzufolge um Inhaltsstoffe der Mikrocarrier selbst handeln, die das Zellwachstum und die Anheftung der Herzzellen verhinderten, da von den explantierten Zellen regelmäßig vor Zugabe der Mikrocarrier Proben stationär explantiert wurden, die ganz regulär wuchsen, und es außerdem aus der in der Einleitung genannten Literatur und Erfahrungen unseres eigenen Labors seit längerer Zeit bekannt war, daß derartige Zellen unter Bedingungen der Rührkultur langfristig gehalten werden können.

Daraufhin versuchten wir, durch intensives Waschen der Mikrocarrier mit destilliertem Wasser und 1 M NaCl (alternierend 5 mal) die vermuteten zytotoxischen Substanzen zu entfernen. Anschließend wurden die Partikelsuspensionen, soweit notwendig und möglich, in PBS autoklaviert, mit dem Medium äquilibriert und unter den oben gegebenen Bedingungen den Zellsuspensionen zugesetzt. Nach dieser Behandlung gelang es, auf 3 Typen von Mikrocarriern Zellen anzusiedeln. Das beste Ergebnis zeigte der Mikrocarrier Cytodex 3 , ein etwas weniger gutes der Mikrocarrier Cytodex 1; das Ergebnis auf dem Mikrocarrier Biosilon war wegen der hohen Lichtbrechung dieser Partikel im Phasenkontrastmikroskop nur schwer zu beurteilen (Abb. 2). Demgegenüber gelang es trotz dieser intensiven Vorbehandlung, weder auf "Biocarriers" noch auf Cytodex^{R} 2 Zellen anzusiedeln.

I.3 Bewuchskinetik von Herzzellen auf Mikrocarriern

Die Haftfähigkeit von Herzzellen auf den 3 Typen von Mikrocarriern, die nach dem Vorhergesagten für die Untersuchungen verblieben, ist außerordentlich unterschiedlich. Durch die optischen Eigenschaften und das hohe spezifische Gewicht sowie den sehr großen Durchmesser sind die Biosilon-Mikrocarrier als Substrat für die Anheftung von Herzzellpopulationen wie

auch von Myoblasten nicht sonderlich geeignet.Besonders bei intermittierendem Rührprogramm verklumpen diese Partikel außerordentlich schnell,so daß es unmöglich wird,überhaupt die Besetzungsdichte eines einzelnen Mikrocarriers zu bestimmen.

I.3.1 Cytodex 3

Der kollagenbeschichtete Mikrocarrier Cytodex 3 wird von Gesamtzellpopulationen wie von Myoblasten mit besonders hoher Affinität akzeptiert.Bereits in stationären Kulturen sieht man,daß die Zellen innerhalb von zwanzig Minuten beginnen,mit den Mikrocarriern Kontakt aufzunehmen.Bei einer geeigneten Relation zwischen Zellzahl und Mikrocarrieroberfläche,die für 5 x $1o^5$ Zellen/ml bei 7.5 cm^2/ml liegt,werden unter Bedingungen der intermittierenden Rührkultur nahezu alle Mikrocarrier innerhalb eines Tages mit einem dichten Zellrasen bewachsen (Abb.3 B).

Diese Bild ändert sich sofort beim Übergang zur kontinuierlichen Rührkultur: Die endgültige Haftfestigkeit auf dem kollagenbeschichteten,aber sonst ungeladenen Cytodex 3 - Partikel ist offenbar so gering,daß diese Zellrasen unter den Bedingungen der kontinuierlichen Rührkultur von den Partikeln abgestreift werden und nun in Form der bereits einleitend erwähnten sogenannten Reaggregate mit wenigen Kontaktstellen am Mikrocarrier verbleiben oder einfach als freie Reaggregate neben den von Zellen entblößten Mikrocarriern in der Suspension mitgeführt werden.Dieses Verhalten erklärt sich vielleicht dadurch,daß das Kollagenlager auf dem Mikrocarrier im Laufe der ersten Kulturtage zerstört wird.Ein rein physikalisches Ablösen des Kollagenlagers entfällt,da das Protein über eine Reaktion mit Epichlorhydrin kovalent mit der Dextran - Matrix verbunden ist.Man könnte aber durchaus an eine proteolytische Zerstörung des Kollagenlagers denken. (Abb. 2 B).

Explantiert man daraufhin diese Mischung aus freien Reaggregaten und mehr oder weniger zellfreien Cytodex 3 -Mikrocarriern in stationäre Kulturen, so kommt es zunächst zur Festsetzung von Aggregaten und Einzelzellen, dann zur Ausbildung auswachsender Zellrasen, die ihrerseits wiederum sehr schnell Kontakt mit den Mikrocarriern aufnehmen und sie in den Rasen inkorporieren, was - wie später gezeigt werden wird - zu einer sehr interessanten Anwendung von Mikrocarriern zur Messung der Kontraktionsaktivität in Zellkulturen geführt hat und uns außerdem veranlaßt hat, anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen, die von Dr. Kopp (Düsseldorf) und Dr. Kartenbeck (DKFZ Heidelberg) vorläufig unternommen wurden, Überlegungen zur Struktur und Zellzusammensetzung dieser sogenannten Reaggregate anzustellen. Dennoch bleibt es unter diesen Bedingungen nahezu unmöglich, eine Wachstumskinetik zu analysieren, zudem für Promyoblasten aus verschiedenen Muskelgeweben bereits von Holtzer et al. (22) eine Generationsdauer von mindestens 18 Stunden überschläglich bestimmt wurde (Abb. 3C,D, Abb. 13).

I.3.2 Cytodex 1

Wir haben uns deshalb darauf beschränkt, die Bewuchskinetik für den Mikrocarrier Cytodex 1 genauer zu untersuchen, da hier sowohl die Anwachsphase als auch die Proliferation von Herzzellen über mehrere Tage gut beobachtbar ist und ein Ablösen der Zellen vom Mikrocarrier in größerem Umfang nur dann erfolgt, wenn Zellen aus einer Rührkultur in eine stationäre Kultur überführt werden. Dieses auch von anderen Säugetierzellen bereits bekannte Verhalten (8,24,44,66,74).
kann dazu dienen, Subkulturen von Herzzellen mit sehr konstanter Zellzahl herzustellen.

Zur Bestimmung der an den Cytodex 1-Partikeln haftenden Zellen wurden mehrfach an aufeinanderfolgenden Tagen 200 - 600 Cytodex-

Partikel auf die Zahl der an ihnen haftenden Herzzellen untersucht, wobei zunächst nur zwischen gestreckten und abgerundeten Zellen differenziert wurde. In diese Zellzählungen wurden Versuche mit kontinuierlichen und diskontinuierlichen Rührprogrammen und Cytodexkonzentrationen zwischen 0.75 und 3.0 g/l bei einer konstanten Ausgangszelldichte von 5×10^5 Zellen/ml einbezogen. Das Endergebnis dieser sehr mühseligen Zählungen zeigt Abb.6-9 . Gleichzeitig wurde durch Bestimmung des Durchmessers von 200 der kugelförmigen Partikel auf dem Fernsehbild die mittlere Fläche der von uns benutzten Cytodex 1-Charge zu 13000 μ^2 bestimmt. Damit ergibt sich bei einer Gesamtfläche von 6000 cm^2/g Cytodex sowohl die Zahl an Partikeln pro Gramm Cytodex 1 mit $4.6 \times 10^7/g$ (in guter Übereinstimmung mit Clark (8) und bei der Gesamtfläche der vorgegebenen Partikel auch ein Maß für die von einer Einzelzelle benötigte Wuchsfläche. Der Vergleich des Mikrocarrier-Bewuchses innerhalb der ersten 3 Tage für dauernd und intermittierend gerührte Kulturen ist in Abbildung 6 näher dargestellt.

Die Abbildungsteile a) und b) der Abbildung 6 zeigen im Vergleich eine konstant gerührte Kultur (B) und eine während drei Tagen intermittierend gerührte Kultur (A). Dargestellt ist das Ergebnis am dritten Kulturtag. Man sieht zunächst, daß in der konstant gerührten Kultur ein relativ hoher Prozentsatz von Partikeln überhaupt keinen Zellbewuchs besitzt und mehr als 50% der Partikel keine differenzierten Zellen aufweist. Im Gegensatz dazu zeigt die intermittierend gerührte Kultur eine Besetzung von nahezu allen Partikeln, weiter Partikel mit mehr als 25 Zellen Besatzdichte, von denen wenigstens 20 differenziert sind. Im Abbildungsteil c) der Abb. 6 ist in einer intermittierend gerührten Kultur neben dem Endergebnis mit einer Bewuchsdichte von schließlich bis zu 25 Zellen pro Partikel der zunehmende Grad der Differenzierung während der 3 Kulturtage aus der Darstellung der jeweiligen Summenkurven deutlich erkennbar. Auch das Säulendiagramm der

Abbildung 7 aus einem anderen unabhängigen Experiment erweist durch die von Tag zu Tag zunehmende Verbreiterung der Histogramme nach rechts eine zunehmende Besetzungsdichte und eine zunehmende Differenzierung der Zellen auf den Mikrocarriern. Auffällig sind vor allem die Rechtsverschiebung für die maximale Besetzungsdichte der Gesamtzellpopulation zwischen dem ersten und zweiten Tag und die Veränderung des Histogramms der differenzierten Zellen zwischen dem ersten und dritten Tag.

Während in diesen Darstellungen versucht wurde, die Besetzungsdichte in irgendeiner Weise zu normieren und durch Gruppenbildung in einfacher Weise zusammenzufassen, zeigt Abbildung 8 eine Reihe von Einzeldaten bei unterschiedlichen Cytodex-Konzentrationen. Man sieht zunächst, daß bei einer Cytodex-Konzentration von nur 0.75 g/l (bezogen auf das Trockengewicht der Mikrocarrier) die insgesamt berechnete Zahl der auf den Cytodex-Partikeln haftenden Zellen geringer ist als die Zahl der in die Kultur eingesetzten Zellen. Es finden also keinesfalls alle eingesetzten Zellen genügend Wuchsfläche; insoweit muß ein größerer Teil der Zellen frei in der Suspension verbleiben, wobei die Partikel selbst eine maximale Bewuchsdichte aufweisen, was in der Tat beobachtet wurde. Bei dieser Cytodex-Konzentration kommt es besonders häufig zu einer Verklumpung durch Zellkontakte zwischen einzelnen Zellagern auf den Partikeln, die bei höheren Cytodex-Konzentrationen auch bei kontinuierlichem Rühren erst am vierten Kulturtag beobachtet werden (siehe hierzu Abbildung 3-5, Abb. 15A).

Bei Konzentrationen von 1.5 und 3.0 g Cytodex/l werden signifikant höhere Zellzahlen erreicht als im Primärinokulum vorgegeben. Allerdings zeigte sich bei einer Konzentration von 3.0 g Cytodex/l eine sehr unregelmäßige Besetzung der Mikrocarrier mit relativ wenigen Zellen, so daß für die meisten folgenden Experimente 1.5 g Cytodex/l vorgegeben werden konnte. Hier stellte sich zwischen dem zweiten und dritten Kulturtag

ein Zahlengleichgewicht zwischen frei flottierenden und auf den Mikrocarriern haftenden Zellen ein, wobei - wie der untere Teil der Abbildung 8 zeigt - sich das Zahlenverhältnis zwischen abgerundeten (möglicherweise mitotischen) Zellen und gespreiteten Zellen zugunsten der gespreiteten Zellen verschiebt. Dies geschieht offenbar bei 1.5 g Cytodex/l früher als bei 3.0 g Cytodex/l. Beide genannten Befunde erweisen, daß sich Herzzellen in Gegenwart von Cytodex 1 vermehren und aus primär abgerundeten Zellen innerhalb von drei Tagen differenzierte Herzzellen hervorgehen. Die maximale Besetzungsdichte, die überhaupt bei diesen Experimenten gefunden wurde, betrug 32 Zellen pro Partikel, während normalerweise eine Besetzungsdichte von im Mittel zwanzig Zellen pro Partikel beobachtet wurde. In Abbildung 9 ist die Verteilung der Partikelflächen über der zugehörigen mittleren Partikelbesetzungsdichte aufgetragen, woraus sich dann in einfacher Weise für den Flächenbedarf einer Zelle unabhängig von ihrer Größe ein Wert von 650 μm^2 pro Zelle ergibt. Vernachläßigt man den Flächenbedarf abgerundeter Zellen, so ergibt sich für die gespreiteten Zellen (im wesentlichen Fibrozyten und Myozyten) ein ungefährer Flächenbedarf von 1000 μm^2 pro Zelle. Diese Werte sind in Form linearer Korrelationen (wie in der Abbildungslegende angegeben) gut darstellbar und somit von der Partikelgröße offenbar unabhängig (zur Auswertung der Daten siehe (3)).

II. ENTWICKLUNG VON HERZZELLEN UND HERZZELLFRAKTIONEN AUF MIKROCARRIERN

II.1 Mitoseaktivität

Die Zellvermehrung, insbesondere in Gegenwart höherer Mikrocarrier-Konzentrationen, bis zum rund Dreifachen der eingesetzten Zellzahl innerhalb von drei Tagen ließ den Schluß zu, daß zumindest ein Teil der eingesetzten Herzzellen zu Mitosen fähig ist. Mit Sicherheit gilt dies für fibroblastenartige Zellen. Daß auch Myoblasten unter diesen Bedingungen mitoseaktiv bleiben, konnte in mehrfacher Hinsicht zunächst rein qualitativ beobachtet und dokumentiert werden. Wir haben sowohl an der Oberfläche von Mikrocarriern, insbesondere vom Typ Cytodex 3 , als auch unter den Zellen, die frei in der Mikrocarrier-Suspension flottierten, Einzelzellen beobachtet, die unmittelbar nach der Explantation in eine Stationärkultur erwiesenermaßen kontrahierten und gleichzeitig eine Durchschnürung im Sinne der Telophase einer Mitose aufwiesen, die sich zusehends verstärkte und nach einer halben bis einer Stunde zwei Einzelzellen ergab (Abb. 10).

Diese qualitativen Befunde lassen sich in mehrfacher Weise ergänzen, indem man den Kulturen nach den Angaben von Lampidis die Antibiotika Adriamycin oder Mitramycin zusetzt. Diese Antibiotika werden bei sehr niedriger Konzentration in Herzzellkulturen vorzugsweise an die DNA von Muskelzellkernen gebunden, während Fibroblastenkerne und andere Kerne stark mitoseaktiver Zellen nahezu keins dieser Antibiotika aufnehmen. Es wird dann durch den Vergleich der Antibiotikafluoreszenz mit dem Phasenkontrastbild eine Quantifizierung der Mitoseraten möglich (Abb. 11, 12).

Für diese Experimente wurden Zellen verwandt, die aus einer Suspensionskultur auf Cytodex 1 stammten und einen Tag nach der Explantation im wesentlichen als Aggregate auf kollagenbeschichteten Glasträgern festsaßen. Die Zellen waren während

der Präparation vom größten Teil der Fibroblasten abgetrennt worden, so daß hier ein relativ geringer Fibroblastenanteil an der Peripherie der Aggregate auswuchs. Die Aggregate kontrahierten in der Kultur regelmäßig.
Die kollagenbeschichteten Glasträger wurden kurz in PBS gewaschen und dann in einem Kulturmedium (Waymouth oder F 12) mit einem Zusatz von 30 µg/ml Adriamycin für 30 bis 60 Minuten inkubiert.

Bereits nach dieser kurzen Inkubationszeit wird der bekannte kardiotoxische Effekt des Adriamycins außerordentlich deutlich: die Schlagaktivität - wenn überhaupt noch vorhanden - äußert sich lediglich in langsamen "ziehenden" und sehr langsam abflauenden Kontraktionswellen. Zugleich beginnt ein deutlicher Zerfall typischer Myoblasten, so daß nach längeren Inkubationszeiten kaum unverletzte Myoblasten darzustellen sind. Im Fluoreszenzbild (Anregungswellenlänge 496 nm) sieht man eine deutlich rötlich-gelbe Fluoreszenz, die ausschließlich auf solche Zellen beschränkt bleibt, die sich in der Mitte der Aggregate befinden, womit angenommen werden kann, daß das Zentrum dieser Aggregate aus Myoblasten besteht (Abb. 11).

Man könnte einwenden, daß Adriamycin aus großen Zellagregaten durch die nachfolgende kurze Spülung im Originalmedium nicht ausgewaschen werden kann. Wir haben deshalb besonders die Fluoreszenz in sehr kleinen und aufgelockerten Zellaggregaten untersucht und sehen auch hier die Kernfluoreszenz ausschließlich auf solche Zellen beschränkt, die durch ihren starken Phasenkontrast bereits von einer Reihe von Autoren als Myozyten oder Myoblasten beschrieben wurden (Abb. 12).

Mit dem gleichen Verfahren lassen sich auch vereinzelte Myozyten und Myoblasten in Präparationen darstellen, die vorzugsweise aus Fibroblasten und endothelialen Zellen bestehen. Andererseits zeigen die Zellen größerer Zellaggregate leichte Unterschiede in der Fluoreszenzintensität, woraus aber eher zu schließen ist, daß das Antibiotikum in größere Zellaggregate nicht allzu tief einzudringen vermag. So werden die

peripheren Myoblasten wesentlich stärker angefärbt als tiefer liegende Bereiche von Myoblasten - Reaggregaten.

II.2 Spontane kontraktile Aktivität

Den besten Beweis für die Differenzierung von Herzmuskelzellen stellt die spontane kontraktile Aktivität dar.Bereits bei den ersten Experimenten mit dem Mikrocarrier Cytodex 1 ließ sich eindeutig sowohl an Einzelzellen als auch an trägerbedeckenden Monolayern die Kontraktionsaktivität nachweisen.Sie erschien im allgemeinen etwas unregelmäßiger als die kontraktile Aktivität gleichalter Monolayer in stationären Kulturen.Dafür erhält man auf Mikrocarrier - Kulturen bis zum dritten Kulturtag für die Monolayer auf jedem einzelnen Mikrocarrier jeweils eine andere Grundfrequenz;dies könnte für sehr viele pharmakologische Experimente von Nutzen sein (Abb. 14 A ,B).

Die spontane Kontraktionsaktivität einzelner Monolayer bleibt auch dann erhalten,wenn sich die Zellrasen beim Übergang zur stationären Kultur von den Mikrocarriern ablösen,wie bereits oben für den Träger Cytodex 3 geschildert .Eine Synchronisation der Monolayer tritt erst dann ein,wenn Kontakte zwischen den Myozyten gebildet oder auch über Fibroblasten vermittelt werden,wobei offenbar auch zwischen verschiedenartigen Zellen eine elektrotonische Erregungsübertragung möglich ist,wie bereits Goshima und seine Mitarbeiter (15) gezeigt haben.Durch elektrische Feldreizung lassen sich weiter solche Aggregate zu regelmäßigen Kontraktionsfolgen anregen,die nicht spontan kontrahieren,wie dies besonders häufig in älteren Kulturen der Fall ist.

Für die Feldreizung wurden Platinelektroden bis zum Grund des Kulturgefäßes eingebracht und mit einem Reizgerät verbunden. Rechteckreize von 9 Volt/cm und 1o msec Dauer führen bis zu einer Frequenz von 24o/min. zu regelmäßigen,darüber hinaus zu unregelmäßigen Kontraktionsfolgen.

Leider war es nicht möglich,flottierende Cytodex 1 - Partikel während der elektrischen Reizung so zu fixieren,daß die kontraktile Aktivität mittels dynamischer Cytophotometrie verfolgt werden konnte,weil unter den Bedingungen elektrischer Reizung der mit DEAE - Gruppen beladene Partikel elektrophoretisch zur Kathode gezogen wird.

II.3 Verbesserung der Registriertechnik durch Inkorporation von Cytodex 3 in Zellmonolayern

Unter den bisher in unserem Labor üblichen Meßverfahren zur dynamischen Cytophotometrie (Abb.1) wird die Kontrastschwankung an der Seite einer kontrahierenden Muskelzelle über eine kleine verstellbare Blende einem Photomultiplier zugeführt, aus dessen Signal lediglich die Frequenzdaten der Kontraktionen zu entnehmen sind.Messungen der Kontraktionskraft und der Kontraktionsgeschwindigkeit gelingen auch bei optimaler Einstellung der Blende am Rand einer kontraktilen Einzelzelle nur ungenau (zur Diskussion siehe (33)).Aus den Kurven lassen sich recht genaue Daten über den Zeitverlauf,aber nur Relativwerte zur Intensität des active state gewinnen (28,29,33).

Als wir dann in Kulturen mit dem Mikrocarrier Cytodex 3 sahen, daß abgestreifte Monolayer aggregierten und sich in stationärer Kultur am Boden des Kulturgefäßes festsetzten,zeigte sich gleichzeitig,daß die Kontraktionskraft dieser Zellen ausreicht, um die Mikrocarrier - Partikel in Kontraktionsrichtung mitzubewegen (abb.13).Diese Bewegung ist an der dem Zellhaufen gegenüberliegenden Seite des kugelförmigen Mikrocarrier - Partikels am stärksten.Setzt man an dieser Stelle

eine längliche Meßblende so,daß die Bewegung in Richtung der Länge der Meßblende erfolgt,so wird die Auslenkung der Kugel als prozentualer Anteil der Blendenlänge gemessen,sofern die Charakteristik des Photomultipliers über die gemessene Lichtintensitätsschwankung linear ist;dies ist geprüft und mehrfach bestätigt.Abbildung 14 zeigt das Ergebnis derartiger Messungen.Insbesondere zeigt der Vergleich von Abb. 14 A/B mit Abb. 14 C/D eine Verbesserung der Signalausbeute für die Kontraktionskurve um den Faktor 5 und für die erste Ableitung der Kontraktionskurve um den Faktor 1o gegenüber einer Registrierung ohne Verwendung der Cytodex - Partikel.Die Verbesserung der Signalausbeute führt gleichzeitig zu einer erheblichen Verminderung des Grundrauschens.

Die so gewonnene Anordnung stellt eine ganz bedeutende Verbesserung für die mikrocytophotometrische Messung von Zellkontraktionen dar.Unter stationären Bedingungen gelingt es nicht nur, die effektive Verkürzungsgeschwindigkeit eines Zellhaufens direkt und störungsfrei zu messen,sondern auch Tonusveränderungen aus der Verschiebung der Basislinie einwandfrei zu registrieren.

Es hat sich weiter gezeigt,daß unter den Bedingungen einer kontinuierlichen Perfusion auch bei hohen Strömungsgeschwindigkeiten (im Mittel 1 mm/sec) keinerlei Versetzung solcher Partikel,die mit einem Zellhaufen verbunden sind,eintritt und keinerlei Pulsationen der vorgeschalteten Rollerpumpe oder der Absaugautomatik sichtbar werden,so daß eine ungestörte Registrierung über viele Stunden möglich ist.

Versuche, aus der Dislokation des Mikrocarriers auch ein Maß für die Kraft der Kontraktion abzuleiten, müßten von Annahmen über die Viskosität des Mediums und den daraus folgenden mittleren Widerstand über den Kugelquerschnitt ausgehen. Diese Versuche sind noch nicht abgeschlossen.

II.4 Wuchsformen von Zellaggregaten zwischen Cytodex-Partikeln und in der stationären Kultur

Bei der Zucht von Mischzellpopulationen auf Cytodex 3 -Mikrocarriern ist selbst bei Übergang zu einer kontinuierlichen Rührkultur am 2. - 3. Kulturtag eine Vernetzung der Partikel über Zellkontakte zwischen den Monolayern nahezu unvermeidbar. Der Vergleich mit reinen Myoblastenkulturen sowohl an Cytodex 3 als auch an Cytodex 1 lehrt, daß diese Vernetzungen oder Verklumpungen im wesentlichen auf der hohen Kontaktaktivität von Fibroblasten beruhen (Abb. 15). Eine reine Myoblastenkultur ist wesentlich länger, zumindest aber sieben Tage in Form einzelsuspendierter bewachsener Träger haltbar, während fibroblastenhaltige Mischzellpopulationen spätestens am vierten Kulturtag Verklumpungen von oft mehr als zwanzig Mikrocarriern aufweisen. Die im Rahmen der Myoblastenfraktionierung anfallende Fibroblastenfraktion ließ sich unter unseren Kulturbedingungen bei Verwendung eines intermittierenden Rührprogramms während der Anwachsphase überhaupt nicht in Form einer Suspension einzelner Partikel kultivieren: bereits während 12 Stunden intermittierenden Rührens verklumpen die Mikrocarrier so stark, daß sie bei geringen Rührgeschwindigkeiten absinken und ein dichtes Lager auf dem Boden des Rührgefäßes bilden. Dies entspricht ganz den Beobachtungen von Polinger (54), die versuchte, Myoblasten im Wege der Methode des "differential settlings" von Myoblasten zu trennen.

Die Methode des "differential settlings" benutzt die Tatsache, daß Fibroblasten wesentlich schneller Kontakte zum Boden eines Kulturgefäßes ausbilden als Myoblasten. Auf diese Art und Weise werden Fibroblasten in einer stationären Kultur bei halbstündigem Wechsel der Unterlage zu großen Teilen nach insgesamt zwei Stunden aus Mischzellpopulationen entfernt; unter den verbleibenden Zellen setzen sich danach im Wesentlichen Myoblasten auf dem Boden des Kulturgefäßes fest, wonach undifferenzierte Zellen ohne Kontakt zur Unterlage beim folgenden Mediumwechsel entfernt werden. Die Reinheit derartiger Myoblastenpräparationen aus Herzen von Ratte, Maus und Huhn wird nach unseren Beobachtungen gegenüber den Zahlen anderer Autoren (85 - 98%) allerdings als allzu optimistisch beurteilt (e.g. 34, 54,55).

Für die Kultur von Fibroblasten sollte demzufolge ein intermittierendes Rührprogramm einerseits auf einen wesentlich kürzeren Zeitraum von höchstens 4 Stunden begrenzt werden und unmittelbar danach mit höheren Rührgeschwindigkeiten gearbeitet werden. Die Ausarbeitung eines speziellen Fibroblastenprogramms lag allerdings außerhalb der Zielsetzungen dieser Arbeit und wurde daher nicht weiterverfolgt. Das Vorhandensein von Fibroblasten innerhalb von Zellaggregaten läßt sich sehr schnell und eindeutig aus der Wuchsform dieser Aggregate zwischen Cytodex-Partikeln und nach Überführung in eine stationäre Kultur demonstrieren, wie die Abb. 15 und 18A zeigen. Fibroblasten sind die ersten Zellen, die aus Zellaggregaten radiär auswachsen und damit die Aggregate auf der jeweiligen Trägerfläche verankern. Diese Verankerungen werden bereits 6 Stunden nach der Explantation sichtbar und zeigen sich genauso zwischen suspendierten, aggregierten Cytodex-Partikeln auch unter den Bedingungen der kontinuierlichen Rührkultur. Ganz anders verhalten sich reine Myoblastenaggregate, bei deren Explantation zwar eine Kontaktaufnahme mit der Unterlage, jedoch sehr selten innerhalb der ersten zwei Tage eine radiäre Ausbreitung langgestreckter Zellen erfolgt. Vielmehr erscheinen diese Aggregate zunächst geschlossen und flachen erst am dritten Tage unter starker Flächenausbreitung ab. Eine Kontaktaufnahme reiner Myoblastenaggregate erfolgt wesentlich langsamer als die von Mischzellaggregaten (Abb. 15B).

Mischzellaggregate wie Myoblastenaggregate bilden je nach Dichte und Kulturdauer schließlich Zellager aus, die entsprechend ihrer Zusammensetzung ein sehr unterschiedliches Wachstumsverhalten zeigen. In Mischzellaggregaten überwiegen aufgrund ihrer hohen Teilungsrate oft bereits nach 7 Kulturtagen die Fibroblasten so stark, daß der Anteil der Myoblasten aus noch ungeklärten Gründen nahezu verschwindet und damit die Kontraktionsaktivität erlischt.

Wir haben nicht weiter geprüft, zu welchem Zeitpunkt die Teilungsaktivität der Fibroblasten zum Stillstand kommt, sehen aber an der großen Flächenausbreitung dieser Zellen, daß offenbar auch die Anzahl der Fibroblasten sich nach und nach verringert und gleichzeitig die Flächenerfüllung der verbleibenden Zellen zunimmt. In jedem Falle sind Kerne dieser Zellen nicht in der Lage, Adriamycin selektiv zu speichern, wie J. Straschewski in Anlehnung an das Verfahren von Lampidis et al. (35) zeigen konnte (47).

Reine Myoblastenaggregate zeigen lediglich ausnahmsweise und inselförmig geringe Verunreinigungen von Fremdzellen,die,wie unten gezeigt wird,mit immunhistochemischen Methoden leicht zu charakterisieren sind.Im Gegensatz zur Mischzellkultur sind die aus diesen Kulturen hervorgegangenen Monolayer über lange Zeit zu spontaner kontraktiler Aktivität fähig.Die längste bei uns beobachtete Haltungsdauer unter Erhaltung der kontraktilen Aktivität betrug 52 Tage.Auch dann,wenn die spontane Kontraktionsaktivität in reinen Myoblastenkulturen erlischt,läßt sich die Fähigkeit dieser Kulturen zur Kontraktion entweder durch elektrische Feldreizung oder auch durch eine Behandlung mit Trypsin für 3o - 6o Sekunden nachweisen.

Offenbar bewirkt die Trypsinbehandlung eine geringfügige Schädigung der Zellmembran und damit eine Erhöhung des Depolarisationsstroms;dies führt zur Spontandepolarisation und damit zur kontraktilen Aktivität.

II.5 Myoblastenzucht unter Dexmethason

Es ist schon seit vielen Jahren bekannt,daß Glucocorticoide bei hohen Konzentrationen in der Lage sind,die Myoblastendifferenzierung zu zerstören,andererseits aber bei niedriger Konzentration selektiv die Proliferation von Fibroblasten zu verhindern,ohne die Differenzierung der Myoblasten einzuschränken.Von diesen Befunden ist zeitweilig therapeutisch vor allem bei der Wundbehandlung in der Pädiatrie Gebrauch gemacht worden: Schwere Nekrosen,die nach der Injektion von Depotcorticoiden in den kindlichen Skelettmuskel entstehen, verheilen besser und mit geringerer Bildung von Narbengewebe in Gegenwart geringer Mengen von Glucocorticoiden (31).

Wir haben in mehreren Versuchsreihen den Einfluß von Dexamethason auf die Zellentwicklung von nahezu reinen Myoblastenkulturen und von Mischzellkulturen untersucht,wobei die Konzentration von Dexamethason zwischen $1o^{-12}$M und $1o^{-6}$M variiert wurde.In nahezu reinen Myoblastenkulturen gibt es typischerweise nach dem vierten Kulturtag immer wieder Inseln von Fibroblasten.In den gleichen Zeitraum fällt,wie bereits erwähnt,der Beginn einer Fibroblastenproliferation in Mischzellkulturen, die innerhalb weniger Tage zu fast völligem Überwachsen der Kulturen mit Fibroblasten führt.Unsere Prüfung ergab,daß bei $1o^{-9}$M Dexamethason eine optimale Hemmung der Fibroblastenpopulation eintritt,ohne daß eine wesentliche Beeinflussung der Myoblastendifferenzierung zu beobachten ist (Abb.16).

Bei einer Konzentration von über $1o^{-7}$M Dexamethason tritt der Tod aller kultivierten Zellen spätestens nach 5o Stunden ein. Eine Reihe von Kulturen wurde aufgrund dieser Beobachtungen unmittelbar nach der Explantation und dann wochenlang in Gegenwart von $1o^{-9}$M Dexamethason gehalten,entsprechend der bekannten Affinitätskonstanten für Corticoidbinder im Rattenherzen (1,13).

II.6 Gerichtete Kontraktion und Ausbildung von Muskelsträngen in Gegenwart von Cytodex 3

Die hohe Affinität der Muskelzellen zu dem kollagenbeschichteten Mikrocarrier Cytodex 3 führte zu einem weiteren Phänomen,das die Ausbildung gerichtet - kontraktiler Zellstränge zuläßt.Die hohe Kontraktionsaktivität geschlossener Myoblastenmonolayer führt oft dazu,daß das Zellager am Rand der Kultur den Zugkräften nicht mehr widersteht und abreißt. Ist ein solches Zellager mit einer geringen Anzahl von Cytodex 3 - Partikeln beschichtet,so hüllt es nach dem Abreissen die oberflächlich gelagerten Mikrocarrier ein,so daß zunächst ein Schlauch entsteht,der dann neue Haftpunkte an den Mikrocarriern ausbildet und sich andererseits durch senkrecht zum Zellager auswachsende Zellausläufer und Zellen an der kollagenbeschichteten Decke des Glasträgers erneut festzuheften vermag (Abb.17 - 19).Der ganze Prozeß nimmt nur wenige Stunden in Anspruch und führt nun zu einer völligen Veränderung der Zugrichtung für die in diesen Schlauch inkorporierten Myoblasten. Während in einem geschlossenen Monolayer die synchrone Kontraktion der Zellen radiale Zugkräfte ausgehend von Kontraktionszentren bewirkt,kontrahieren die Zellstränge,die in den Cytodex - Kulturen gebildet werden,nun synchron in einer Richtung.Es ist bereits im Phasenkontrastmikroskop zu beobachten, daß sich Zellen innerhalb von 2 Tagen in Zugrichtung verlängern und die Myofibrillen in Zugrichtung ausgerichtet werden.Es war zu erwarten,daß auf diese Weise eine Addition der Zugkräfte in Kontraktionsrichtung erfolgen sollte:Wir konnten in der Tat beobachten,daß die Kontraktionen derart gebildeter Muskelstränge um ein Mehrfaches schneller und kräftiger verliefen als die Radialkontraktionen der Ausgangsmonolayer.Ein Muskelstrang,der während eines Experiments abriß,setzte sich dann aber wieder fest und kontrahierte bereits nach wenigen Stunden erneut.Der längste beobachtete Zellstrang war 8 mm lang,hatte sich am 21. Tag nach Kulturbeginn gebildet und kontrahierte rhythmisch bis zum 52. Kulturtag.Die Umbildung zu gerichteten

Zellsträngen war in 4 voneinander unabhängigen Experimenten jeweils mehrfach reproduzierbar,so daß wir solche Präparate zur elektronenmikroskopischen Begutachtung dem Pathologischen Institut zur Verfügung stellen konnten;Ergebnisse liegen bisher noch nicht vor.

II.7 Darstellung von Myofibrillen und desmosomalen Proteinen durch Immunfluoreszenz

Der Beweis für die Verteilung von Myoblasten auf Mikrocarriern und innerhalb der voraufgehend beschriebenen Zellaggregate und deren Entwicklung ist leicht durch die Darstellung myofibrillärer Proteine und deren Anordnung in Myofibrillenstrukturen zu führen. Weiter haben Franke et al. (12) zeigen können, daß myogene Zellen im Herzmuskel als spezifische Strukturproteine der 100 Å-Filamente exklusiv Desmin enthalten, während nicht-myogene Zellen durch das Strukturprotein Vimentin charakterisiert sind. Für den Herzmuskel - und zunächst ausschließlich für diesen - gilt weiter, daß nur die myogenen Zellen die beiden Komponenten des Desmoplakins enthalten, die wiederum bei nicht-myogenen Zellen fehlen. Desmin und Vimentin zeichnen sich durch eine gemeinsame Aminosäuresequenz aus, die etwa 20 Aminosäuren umfaßt. Das führt für den immunologischen Nachweis zu gelegentlichen Kreuzreaktionen (27 und die dort zitierte Literatur).
Insgesamt bietet sich an, neben der Kerncharakteristik durch Adriamycin diese charakteristischen Proteinkomponenten durch Immunfluoreszenz darzustellen und neben morphologischen und elektronenmikroskopischen Befunden weitere Charakteristika für den Differenzierungszustand und die Differenzierungspotenz der von uns gezüchteten Herzmuskelzellen zu erarbeiten.

Für die Darstellung der Myofibrillen kommen vor allem periphere Bereiche der Zellaggregate in Frage. Ein Antikörper gegen Myosin (Abb. 20) zeigte bereits an Zellaggregaten 5 Tage nach Kulturbeginn lange, oft verzweigte und einander überlappende

periodische Myofibrillenstrukturen in nahezu allen peripheren Zellen von Aggregaten im Stadium der beginnenden Abflachung. In den gleichen Zellen ließen sich Desmin und Desmoplakin nachweisen. Desmin ist in zweifacher Weise geordnet: einerseits gibt es große Reihen gestreckter Filamente, die lateral im Bereich des Z-Bandes in die Sarkomere einmünden, andererseits ein weniger geordnetes und weniger gestrecktes Filamentsystem, ebenfalls weitgehend parallel zur Myofibrillenanordnung, das in Membranelemente einmündet. Desmosomen, charakterisiert durch den Antikörper gegen Desmoplakin, kommen in mehreren Reihen pro Zelle quer zur Richtung der Myofibrillen in gezackten Bändern vor und heften die Muskelzellen senkrecht zur Zugrichtung mehrfach aneinander (Abb. 21). Die Gegenfärbung mit Anti-Vimentin, absorbiert mit authentischem Desmin, erlaubte dann die Darstellung des Anteils nicht-myogener Zellen in den Aggregaten. In Kulturen aus reinen Myoblasten wurden hierbei maximal 9% an nicht-myogenen Zellen in Aggregaten bei Zucht unter 10^{-9} M Dexamethason gefunden.

Große Zweifel ergaben sich für die Zuordnung der abgerundeten kleinen Zellen im Zentrum der Reaggregate, die sowohl mit dem Ratten-Antikörper gegen Myosin als auch mit den Meerschweinchen-Antikörpern gegen Vimentin, Desmin und Desmoplakin positive Reaktionen ergaben. Andererseits waren diese Zellen gegen Prekeratin-Antikörper vom Meerschweinchen negativ (J. Kartenbeck, pers. Mitteilung). Allerdings werden in der Literatur Frühstadien in der Myogenese von Skelettmuskeln beschrieben, die sowohl Vimentin als auch Desmin enthalten, wobei der Beginn der Desminsynthese den Zeitpunkt der terminalen Entwicklung zu Muskelzellen festlegt (22,38).
Schon diese Diskrepanzen machten eine elektronenmikroskopische Untersuchung der Reaggregate erfoderlich.

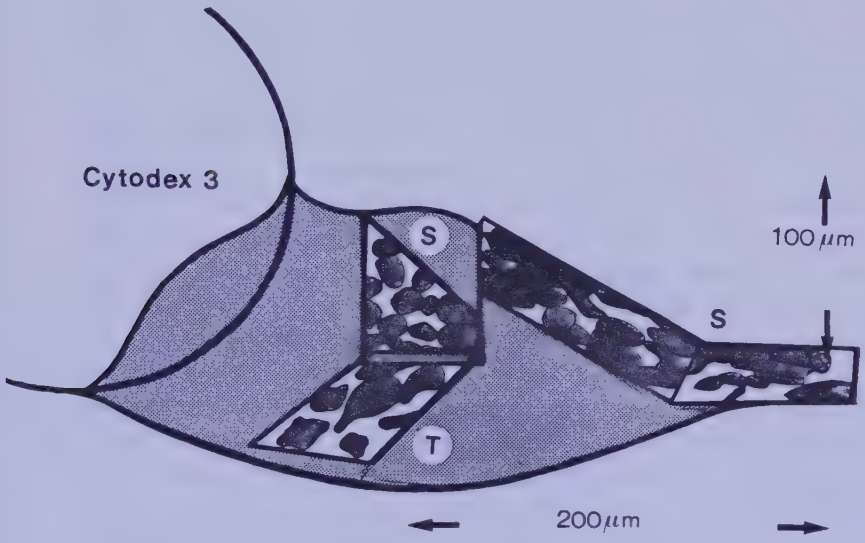
III. ZELLULÄRE UND SUBZELLULÄRE ORGANISATION VON MYOBLASTEN-REAGGREGATEN NACH KULTUR AUF CYTODEX 3 - MIKROCARRIERN

Reaggregate aus mehr oder weniger mit Myoblasten angereicherten Zellpräparationen ("differential settling", 54) von embryonalen oder neugeborenen Ratten, Mäusen und Hühnern sind seit etwa 12 Jahren Untersuchungsgegenstand zahlreicher Arbeitsgruppen gewesen (9,23,26,45,51,57,59,61,62,65,67). Einige allgemeine Angaben über den zellulären Aufbau der Reaggregate unter Hinzuziehung weniger elektronenmikroskopischer Befunde hat zusammenfassend Sperelakis (65) gegeben. Spezielle Probleme im Zusammenhang mit der Bildung gemeinsamer Zellverbindungen zwischen aggregierten Myoblasten zweier Vogelspezies (Hühnchen - Wachtel) haben Crossin et al. (9) bearbeitet. Weiter existiert eine sehr spezielle elektronenmikroskopische Untersuchung, kombiniert mit elektrophysiologischen Befunden, von Williams und DeHaan (70), wobei die Autoren die für die elektrotonische Reizübertragung mutmaßlich verantwortlichen "gap junctions" (vergleiche 14,15,49) merkwürdigerweise nicht auffinden konnten. Eine generelle Beschreibung des zellulären und subzellulären Aufbaus von Myoblastenreaggregaten, die auch die Lokalisation der Einzelzelle innerhalb der Reaggregate bezüglich ihrer strukturellen Differenzierung berücksichtigt, gibt es nach unserer Kenntnis bisher noch nicht.

III.1 Zellulärer Aufbau der Reaggregate

Für unsere Untersuchungen wurden Myoblasten-Reaggregate einer standardisierten Größe ausgewählt (vgl. Abb. 3C,D, Abb. 13), wie sie nach Anzucht auf dem Mikrocarrier Cytodex 3 häufig entstehen. Die auf der kollagenbeschichteten Glasunterlage angewachsenen und oft mit dem Cytodexpartikel verbundenen Reaggregate haben im Zentrum eine Höhe von 0.1 mm und breiten sich im Laufe von 3 Tagen über eine Fläche von 0.04 - 0.16 mm^2

aus.Wir haben solche Aggregate am 5. Kulturtag fixiert,eingebettet und so orientiert,daß sowohl der Sagittal- als auch der Transversalschnitt an jeweils mindestens 3 Objekten in mehreren Aufnahmeserien vollständig untersucht werden konnte. Die untersuchten Bereiche wurden nach folgendem Arbeitsschema ausgewählt:



Schematische Darstellung eines Myoblastenreaggregats
Elektronenmikroskopisch untersucht wurden zentrale und periphere Sagittalschnitte S und der basale Transversalschnitt T von jeweils mindestens 3 Aggregaten.

Der Sagittalschnitt S durch den zentralen Teil solcher Reaggregate zeigt abgerundete Zellen mit einem maximalen Durchmesser von 12 µm,die zu großen Teilen enge Zellverbindungen aufweisen,zwischen denen aber große,strukturarme Lückenräume

auftreten, die z.T. mit geringen Proteinpräzipitaten, z.T. auch mit Resten von Zellorganellen zerfallener Zellen angefüllt sind. Die Lückenräume reichen sowohl im Sagittalschnitt wie auch im Transversalschnitt bis an die Basis der Reaggregate, wobei sie in der Peripherie, vorallem an den lateralen Anheftungsstellen vermehrt und vergrößert auftreten. Die große Zahl schmaler Zellquerschnitte im Raum der Verankerungsstellen, die das Aggregat in seiner Gesamtheit in der Kollagenschicht der Glasträger fixieren, deutet auf eine Vernetzung sehr langgestreckter, fingerförmiger Zellen in der Peripherie hin. Von dort ausgehend ziehen sich stark gespannte, abgeflachte Muskelzellen mit weitgespannten Zellverbindungen über das gesamte Aggregat hin, wobei alle Übergänge bis hin zu den runden Zellen im Inneren des Aggregats über vier Zellschichten zu beobachten sind. Auch in diesem oberflächlichen Bereich der Aggregate deutet die sehr unterschiedliche Fläche und Ausrichtung von Zellängs- und -querschnitten auf eine interdigitierende Verflechtung. Anschnitte lakunenartiger Kanäle (K in Abb. 32) innerhalb des oberen Zellagers finden sich zumeist erst im Bereich der zweiten Zellschicht und haben dort wie innerhalb des Zellhaufens Durchmesser von 2 bis höchstens 4 µm. Wir stellen uns vor, daß durch diese Kanäle während der Kontraktion des Zellhaufens die perizelluläre Flüssigkeit ausgepreßt und bei der Relaxation das Kulturmedium zwischen die Zellen eingesogen wird,sodaß vermittels dieser Pumpbewegung eine Versorgung auch der inneren und der an der Basis des Zellhaufens liegende Zellen gewährleistet wird.

Transversalschnitte T wurden nur von der Basis der Zellaggregate um wenige µm oberhalb der Auflagefläche angefertigt und untersucht.Sie zeigen,daß sich die abgerundeten Zellen im Inneren des Aggregats nach unten hin mehr und mehr abflachen und wiederum weitläufige und sehr stabile Zellverbindungen schaffen.Besonders in diesem Bereich stellt sich eine sehr

reguläre Anordnung der Myofibrillen ein, die später eingehend diskutiert werden muß. Jedenfalls zeigt die gerichtete Anordnung der Myofibrillen in diesem Bereich (Abb. 27), daß die Zellen an der Basis der Aggregate nicht allein an deren Anheftung an der Kollagenunterlage, sondern auch wesentlich am kontraktilen Geschehen mitbeteiligt sind.
Im übrigen hat die weitere ultrastrukturelle Charakterisierung der insgesamt rund 120 auf den Schnitten untersuchten Zellen nur 2 Schnitte durch Nicht-Muskelzellen ergeben (Abb. 35), während alle anderen Zellen aufgrund ihrer spezifischen Differenzierungsmerkmale als Myoblasten und Myocyten charakterisiert werden konnten.

III.2 Cytoplasmatische Organellenausstattung

Die Z e l l k e r n e sind in der Regel stark gelappt und zeigen in der Peripherie dichte Anlagerungen eines feinkörnigen Materials, das sich zur Kernmitte hin auflockert sowie gelegentlich einen einzelnen dichten Nukleolus. Zentriolen wurden in unseren Präparaten nicht beobachtet. Kernporen wurden nur in vereinzelten Fällen beobachtet (Abb. 23).
M i t o c h o n d r i e n werden sowohl in Kernnähe als auch an der Zellperipherie regelmäßig in großen Häufungen und in unterschiedlichsten Formen des Querschnittes angetroffen. Die Ausbildung der Cristae mitochondriales ist nicht immer gleichartig: es wechseln Bilder mit sehr eng gestapelten (Abb. 22, 34) und weiter auseinander gerückten Cristae (Abb. 24, 29B, 32) einander ab, ohne daß dies einen systematischen Zusammenhang mit der Lokalisation der Trägerzelle innerhalb des Aggregats ergäbe. Insofern scheint es sich hier nicht um Fixierungsartefakte zu handeln. In einer ganzen Reihe von Fällen sieht man Stadien eines Abbaus von Mitochondrien zu stark osmiophilem Material. Der Abbau beginnt in der Regel in der Peripherie der Mitochondrien (Abb. 22, 24, 27, 29A, 26A), wobei noch Teile

des Mitochondriums durchaus intakt erscheinen, und endet entweder in der Form einer elektronenoptisch leeren osmiophilen Hülle oder in deformierten Plaques (M' in Abb. 27). Darüberhinaus gibt es vielfach membranumschlossene Lipide geringerer Osmiophilie (Abb. 35), die wir als Speicherlipide deuten. Speicherglykogen konnte nur in Ausnahmefällen im intermyofibrillären Raum eindeutig identifiziert werden (Abb. 29B).

In sämtlichen Zellen findet sich ein wohlausgebildetes endoplasmatisches Retikulum und ausgeprägte Stadien einer vielfältigen Pinocytose. Nahezu jeder Zellkern ist von einem dichten System von Golgi-Vesikeln umgeben (Abb. 23, 35). Weiter finden sich verschiedene Stadien von Pinocytose-Vesikeln (Abb. 28B, 30, 34) und häufig "multi vesicular bodies" (Abb. 24, 28B) sowie gelegentlich Lysosomen (Abb. 29A). Spezifische Ausbildungen des longitudinalen Systems des sarkoplasmatischen Retikulums konnten nur vereinzelt dokumentiert werden (Abb. 29B).
Das rauhe endoplasmatische Retikulum ist oft dicht und begleitet von einer großen Zahl zum Teil langer Polysomen mit im Mittel 9 Ribosomen auf 230 nm Länge (N = 28). Insbesondere finden sich viele Ribosomen an der Peripherie und innerhalb von Myofilamenten relativ geringer Fibrillendichte, was zumindest in dieser Lokalisation für eine Syntheseaktivität für myofibrilläres Material spricht, wie aus der Literatur wohl bekannt (Abb. 24, 25, 27, 28, 29, 32).

Schnitte durch Bündel von Myofibrillen konnten in nahezu jeder der untersuchten Zellen aufgefunden werden (Abb. 22, 23, 26A, 29, 34). Längsschnitte über längere Strecken zeigte aber nur der Transversalschnitt im basalen Teil der Aggregate (Abb. 27). Dies zeigt, daß vor allem im zentralen Anteil der Aggregate die Myofibrillen in sehr unterschiedlicher Richtung durch die Zelle verlaufen, während im basalen Teil offen-

bar eine Orientierung parallel zur Unterlage eintritt. Nur einige wenige Zellen enthielten klare Sarkomerengliederungen mit sicher abgrenzbarem I-Band, während in den meisten Fällen - offenbar aufgrund der Kontraktion der Zellen während der Fixierung - das A-Band bis unmittelbar an das Z-Band heranreichte (z.B. Abb. 29B). Auch in kontrahiertem Zustand sind die Sarkomeren mit 1.6 - 2 µm übernormal lang.

III.3 Differenzierungen des Plasmalemms

In der Literatur finden sich zwar vereinzelte Angaben über die Differenzierung von Zellmembranverbindungen von kultivierten Herzmuskelzellen, insbesondere über Differenzierungen im Bereich interzellulärer Glanzstreifen (= "intercalated disc"; 9,30, 48,65,70) im Vergleich zur Glanzstreifenentwicklung im intakten Herzen embryonaler und neugeborener Säuger (16,42,49). Wir werden aber im Folgenden zeigen, daß sich in Myoblastenaggregaten vorallem ein funktioneller Gradient in der Differenzierung des T-Tubulus ausbildet, wobei eine spezifische und bisher nicht bekannte Orientierung der terminalen Zisterne des sarkoplasmatischen Retikulums zur Myofibrillenstruktur auftritt.

Die Grundstruktur des i n t e r c a l a t e d d i s c in kultivierten Herzmuskelzellen ist schon länger bekannt und durch unsere Arbeiten an Desmosomen (Abb. 3 in (27)) für Rattenherzmuskelzellen dokumentiert worden. Die von Williams und DeHaan (70) nicht aufgefundenen "g a p j u n c t i o n s" sind selbstverständlich sowohl in Monolayer-Kulturen (Abb. 34) als auch in Reaggregaten (Abb. 26A) vorhanden und regelmäßig im Verlauf eines intercalated disc aufzufinden. Die "z o n u l a e a d h a e r e n t e s" sind ausgedehnt und zeigen deutlich die Insertion primärer Aktinfilamente (Abb. 26A).

Sie sind öfter unterbrochen von Desmosomenstrukturen (Abb. 25, 26A, 31). In seltenen Fällen erhält man aufgrund einer zum Desmosom tangentialen Schnittführung Bilder wie das der Abb. 26B, in der deutlich die Substruktur des Desmosoms mit der Insertion von intermediären Filamenten sichtbar wird, von denen wir mit immunologischer Methodik wissen (27), daß sie ausschließlich Desmin enthalten (Abb. 21B).

In peripheren Zellen der Myoblastenreaggregate findet sich subsarkolemmal oder im Bereich der Zonula adhaerens eines intercalated disc eine aus mindestens zwei Membranen aufgebaute vesikuläre Struktur einzeln oder auch paarig angeordnet, die typischerweise ausschließlich in Myozyten, nicht aber in Nicht-Muskelzellen auftritt. In tiefer liegenden Zellen der Reaggregate haben wir diese Struktur in Querschnitten und Längsschnitten von T-Tubuli gefunden und aufgrund ihrer Lagebeziehung als terminale Zisternen des sarkoplasmatischen Retikulums identifizieren können (Abb. 28, 29A, 30, 31, 32). Die bereits früher von Kelly und Chako (30) und von Moses und Kasten (48) bei Hühnchen- und Säugerherzzellkulturen dargestellten ähnlichen Strukturen ließen weder eine Identifizierung noch Erkenntnisse über die Lagebeziehung dieser "Dyadenstruktur" zu. Die Strukturen sind identisch mit Innenstrukturen, die Lau et al. (37) in einer Mikrosomenfraktion aus intakten T-Tubuli des Skelettmuskels elektronenmikroskopisch dargestellt und aufgrund ihrer Enzymausstattung als terminale Zisternen des sarkoplasmatischen Retikulums identifiziert haben. Der Querschnitt durch den T-Tubulus (Abb. 28B, 29A, 30) zeigt, daß die terminalen Zisternen bilateral angeordnet sind und (Abb. 29A) direkte Verbindungen zum Z-Band der Sarkomere aufweisen. Auffällig ist aber, daß die terminalen Zisternen in allen Fällen parallel zur Myofibrillenlaufrichtung angeordnet sind und nicht - wie im organisierten Adultmyokard (42 und die dort angegebene Literatur) - senkrecht zur Sarkomerenrichtung und in Register mit dem Z-Band

der Sarkomere. Dabei kommt die terminale Zisterne in den Bereich des A-Bands zu liegen. Zwischen der sarkolemmalen Membran und terminalen Zisterne liegt periodisch angeordnet elektronendichtes Material, ebenso wie im "Lumen" der terminalen Zisterne selbst, wo aber andere Periodenabstände auftreten. Weiter zeigt besonders Abb. 33, daß sich die lateralen Zisternen einseitig zu vesikulären Strukturen geringen Elektronenkontrasts öffnen.

Diese Anordnung, zusammengenommen mit der außerordentlich geringen Ausbildung des longitudinalen Systems des sarkoplasmatischen Retikulums in kultivierten Herzmuskelzellen, läßt überlegen, ob die laterale Zisterne hier gleichzeitig den Einspeicherungs- und Freisetzungsort für das kontraktionswirksame Calcium darstellt. Unter diesen Bedingungen entfiele dann eine Zwischenspeicherung des reabsorbierten Calciums während der Refraktärphase und dessen Umschichtung in die laterale Zisterne, wie sie in gängigen Modellen der elektromechanischen Kopplung angenommen wird. Diese Diskussion bleibt natürlich so lange hypothetisch, als der biochemische Aufbau lateraler Zisternen aus kultivierten Herzmuskelzellen und im Herzmuskel überhaupt noch nicht bekannt ist.

Aufgrund der strukturellen Darstellung in Myoblastenaggregaten wurden dann auch die Dyadenstrukturen in Herzmuskelmonolayerkulturen leicht identifizierbar. Sie liegen auch dort entweder im Bereich der Zonula adhaerens des intercaled disc (Abb. 33A) oder in weiträumiger Ausdehnung an der äußeren Zellperipherie (Abb. 33B), wo sie im Flachschnitt nahezu 40% der Strukturen des Subsarkolemms ausmachen.

Diskussion

Die Kultur substratabhängiger Zellen auf Mikrocarriern bietet die Möglichkeit, große Mengen von Zellen unter homogenen und sehr konstanten Bedingungen in Form einer Suspensionskultur zu züchten. Verschiedene im Handel befindliche Mikrocarrier wurden hier auf ihre Eignung zur Zucht spontan kontrahierender Herzmuskelzellen untersucht. Gerade dieser Test erweist sich als besonders rigorose Prüfung von Mikrocarriern.

Das übliche Kriterium für die Verwendbarkeit eines Mikrocarriertyps ist sein Verhalten gegenüber ausgewählten etablierten Zellinien, wobei die Mitoserate als wesentlichstes Kriterium gilt. Dies eben erschien uns nicht zureichend. Vielmehr ist für Mikrocarrier in erster Linie die Eignung zur zellspezifischen Entwicklung substratabhängiger Zellen zu prüfen, und hier sind Herzmuskelzellen gerade durch ihre integrative Fähigkeit zur Spontankontraktion wohl die schärfste Testbedingung, der ein Mikrocarrier unterworfen werden kann. Die zu erbringende Entwicklungsleistung schließt ja sowohl die Expression der Proteine des kontraktilen Apparats, einer entsprechenden Energieversorgung und der membranständigen Ionenkanäle als auch die Stabilität und Periodik im elektrischen Verhalten mit ein, also das gesamte Gefüge der elektromechanischen Kopplung und der diese beeinflussenden Hormonrezeptorinteraktionen(17). Vergleichbar mit einer solchen Funktionsprüfung ist bis jetzt wohl nur ein System der Differenzierung von Hypophysenzellen auf Cytodex 1-Mikrocarriern, bei dem nachgewiesen werden konnte, daß diese Zellen nach Stimulation mit jeweils spezifischen Neuropeptiden des Hypothalamus selektiv glandotrope Hormone zeit- und konzentrationsabhängig sezernieren (64).

In unseren Experimenten war es erst nach geeigneten Waschschritten und Entfernung ganz offenbar cytotoxischer Substanzen möglich, auf 3 von 5 der verwendeten Mikrocarriertypen überhaupt

Herzmuskelzellen zum Anwachsen zu veranlassen, wobei nach sehr unterschiedlichen Zeiten Spontankontraktionen beobachtet werden konnten, während 2 der angebotenen Mikrocarrier weder ein Anwachsen noch eine funktionelle Differenzierung der Zellen zuließen. Insbesondere acrylamidhaltige Mikrocarrier sind für eine funktionelle Differenzierung von Herzmuskelzellen vollkommen ungeeignet, im Gegensatz zu Angaben der Literatur (72).

Eine limitierte Beladung der Oberfläche von Dextranpartikeln mit Diäthylaminoäthylgruppen (Cytodex 1) sowie die Oberfläche von Polypropylenpartikeln (Biosilon) sind prinzipiell zur Anzucht von Herzmuskelzellen geeignet, wobei auf beiden Partikeltypen ein dauerhaftes Anheften der Zellen auch unter Bedingungen einer konstant gerührten Kultur nach einer Anwachsphase von 24 bis 48 Stunden beobachtet werden konnte. Auf dem kollagenbeschichteten Partikel Cytodex 3 ergab sich erstaunlicherweise eine relativ instabile Monolayerschicht, die bei Übergang zur konstant gerührten Kultur oder bei Explantation in die stationäre Kultur sehr schnell zu größendefinierten Zellaggregaten führt. Und diese Zellaggregate, über die mehrfach in der neueren Literatur berichtet wurde, haben im weiteren Verlauf der Arbeit unsere wesentliche Aufmerksamkeit beansprucht (59).

Obschon nämlich immer wieder die besonders konstante spontane Schlagaktivität derartiger Herzzell-Reaggregate in der Literatur beschrieben wurde (26,57,59), ist die innere Organisation eines derartigen "Herzmodells" unseres Wissens bisher niemals beschrieben worden. Wir werden die Funktionsfähigkeit dieses Modells und seine hormonelle und pharmakologische Beeinflußbarkeit aber nur dann kritisch verstehen können, wenn wir seine funktionelle Zelldifferenzierung auf elektronenmikroskopischer Ebene kennen. Ebenso sollte sich mit immunologischen Methoden, wie auf der Ebene ihrer Ausstattung mit herzspezifischen Enzymen, die herzspezifische Differenzierung solcher Zellreaggregate ablesen lassen, wobei der Erhaltung der

zahlenmäßigen Relation zwischen Myoblasten und nicht-muskulären Zellelementen ein besonderes Augenmerk zu widmen war.

Dieses Vorhaben wurde befördert durch die Isolierung und Charakterisierung einer nahezu reinen Myoblastenfraktion (47) als Ausgangsmaterial für eine Myoblastenkultur auf kollagengeschichteten Mikrocarriern vom Typ Cytodex 3 , die wir mit konventionell zusammengesetzten Herzzellpopulationen vergleichen konnten. Dabei konnte der Myoblastenanteil aus der myonukleären Akkumulation von Adriamycin (47,57,59) bestimmt werden und lag hier wie in unseren bereits publizierten Vorergebnissen bei 92 - 98%.

Wir haben nicht nur die Unterschiede im Wachstumstypus der beiden Aggregatformen dokumentieren können und elektronenmikroskopisch aus der Verteilung von 6 muskelspezifischen Strukturen die Myoblasten eindeutig von nicht myogenen Zellen unterscheiden können, wobei Kriterien für den Erhaltungszustand der Ausgangsrelation zwischen verschiedenen Zelltypen gewonnen werden konnten. Als viel aufschlußreicher und über den gegenwärtigen Kenntnisstand hinausgehend erwies sich die systematische Untersuchung jener "kleinen" Zellen, die das Zentrum der Zellaggregate ausmachen und die sich nach unseren Kriterien als echte Myoblasten kennzeichnen ließen. Obwohl diese Zellen im Gegensatz zu den ausgestreckten und interdigitierenden Zellformen der Peripherie abgerundet und zunächst wenig differenziert erschienen, zeigte sich sehr bald, daß alle diese kleinen Zellen Myofibrillenstrukturen ausbilden ebenso wie muskelzellspezifische Polyribosomen definierter Größe und muskelzellspezifische membrane junctions. Die scheinbare Desorganisation der Myofibrillen im zentralen Teil der Aggregate, verglichen mit der Myofibrillenorientierung in der untersten Zellschicht, läßt sich wohl als eine Orientierung entsprechend der Hauptzugrichtung, der die Zellen jeweils ausgesetzt sind, erklären. Allerdings kann diese Annahme erst dann wirklich

belegt werden, wenn stereoskopische elektronenmikroskopische Aufnahmen für Zellen im Zentrum der Aggregate vorliegen. Immerhin folgt schon jetzt ganz klar, daß diese Annahme mindestens für das periphere Zellager und die Zellen im basalen Teil der Aggregate zutrifft.

Des weiteren hat die elektronenmikroskopische Untersuchung von Myoblastenaggregaten Aufschlüsse über die Differenzierung des T-tubulären Ionenleitungssystems in Abhängigkeit von der Position der Zelle innerhalb des Verbands ergeben. Eine anfänglich unverständliche periodische trilamelläre Membranstruktur in den peripheren Zellschichten, die oft auch im System des intercalated disc auftritt, erwies sich später in transversalen wie auch sagittalen Schnitten durch die Zellhaufen als ein Strukturelement der in tieferen Zellschichten regulär ausgebildeten T-Tubuli. Anzuzweifeln bleibt, ob die "kollabierte" vesikuläre Struktur, die die zweite und dritte Lamelle dieses Komplexes ausbildet (siehe Abb. 31), tatsächlich als Homologon der terminalen Zisterne des longitudinalen sarkoplasmatischen Retikulums gelten kann; denn wir haben auch in Transversalschnitten regelrecht ausgebildete Anteile des Longitudinalsystems auffinden können, die strukturell mit Sicherheit verschieden von dieser juxtamembranären Differenzierung sind. Außerdem konnte bisher keine direkte Verbindung zwischen der beschriebenen trilamellären Struktur und ausgebildeten L-SR-Vesikeln aufgedeckt werden, sofern man nicht die in Abbildung 31 gezeigte polyvesikuläre Struktur als Äquivalent hierzu ansehen will.

Wenn dies so wäre, stellt sich die Frage, wieso periphere Zellen diese T-Tubulus-spezifische Struktur nur in Form periodischer Dyaden besitzen und reguläre T-Tubuli nicht ausbilden, während tiefere Schichten T-Tubuli besitzen. Obwohl wir haben zeigen können, daß diese Zellaggregate bis in ihre basale Zellschicht von großen interstitiellen Versorgungsräumen mit

einem Durchmesser von 2 bis 4 µm durchzogen sind und so die Versorgung auch der basalen Zellschichten garantiert ist, ließe sich vermuten, daß die Ausbildung eines echten T-Tubulus einen Zusammenhang mit einer unvollständigen Ionenversorgung dieser Schichten hat. Ebenso könnte natürlich eine interstitielle Konditionierung (60) für eine reguläre Membrandifferenzierung ausschlaggebend sein. Zumindest ist unseres Wissens in Herzmuskelzellmonolayern niemals eine reguläre Ausbildung von T-Tubuli in der Zellkultur beobachtet worden, wie sie hier wohl erstmalig aufgedeckt werden konnte (vgl. 30). Es wird weiterer Untersuchungen bedürfen, vor allem unter Einbindung des immunologischen Nachweises von Proteinen, die für das L-System des sarkoplasmatischen Retikulums spezifisch sind (z.B. Calsequestrin), um überhaupt eine eindeutige Zuordnung der trilamellären Struktur zu erreichen und nachzuweisen, ob es sich hier tatsächlich um ein Triadenmodell handelt.

Ein solcher Nachweis wäre vor allem deshalb sehr wichtig, als die Arbeitsgruppe um Caswell (37) gezeigt hat, daß die Isolierung von Triadenstrukturen des Skelettmuskels im Saccharose-Dichtegradienten zu einer hohen Anreicherung von beta-adrenergen Rezeptoren samt der an diese gekoppelten Adenylatzyklase führt. Man darf vielleicht spekulieren, daß die dort näher beschriebene spezifische Struktur der T-Tubuli, die im übrigen große Ähnlichkeit mit der hier gefundenen Triadenstruktur aufweist, Assoziationspunkte für derartige Rezeptorenzymsysteme darstellt, die Rezeptoren also nicht in der Membran homogen verteilt, sondern im Bereich ihres Wirkortes geclustert auftreten. Dies wiederum würde nicht nur zu einer leichteren Erfaßbarkeit ihrer Lokalisation führen, sondern für den Fall, daß es gelingt, derartige Strukturen aus dem Herzen nicht nur elektronenmikroskopisch sichtbar zu machen, sondern auch präparativ zu isolieren, zu einem besseren Verständnis der Hormonrezeptorwechselwirkung einerseits als auch der Interaktion zwischen Hormonrezeptorkomplex und Ionenkanälen wie

Ionenpumpen andererseits beitragen.Jedenfalls wird diese Fragestellung in der Folgezeit in unserem Labor geprüft werden (32,1o).

Gegenüber der Verwendung von Cytodex 1 - Partikeln,die wegen ihrer stabilen Substrateigenschaften in besonderem Maße zur Züchtung stabiler Monolayer mit optimaler Flächenbesetzungsdichte geeignet sind und daher in Zukunft die Propagation von Massenkulturen unter homogenen Bedingungen befördern werden, ergeben sich für die Verwendung des Cytodex 3 - Partikels folgende weitere Vorteile :

1. Die Reaggregate werden bei Ablösung von den Partikeln auf einen engeren Größenbereich beschränkt,als dies bei freier Reaggregation aus der Suspension (25,45,59) gegeben ist.Das bedeutet gleiche Diffusionsstrecken für Hormone und Pharmaka und damit eine Verbesserung der Zeitfunktion für den Wirkungseintritt dieser Substanzen,womit zugleich eine bessere Vergleichbarkeit zu Experimenten an Zellmonolayern und Gewebepräparaten gegeben wäre.

2. Die Reaggregate nehmen auch nach vorheriger Trennung wieder Kontakt zu Mikrocarriern auf und erlauben dann,wie oben ausführlich gezeigt,eine erhebliche Verbesserung der lichtoptischen Registriermethodik.Es erscheint sogar möglich,mit dieser einfachen Anordnung Aussagen zum Grundtonus wie zum zeitlichen Verlauf des Inotropieverhaltens machen zu können;das war ohne dieses Hilfsmittel bisher nur bedingt möglich.Man mag einwenden, daß die Inkorporation von Dextran -Partikeln in spontan kontrahierende Zellmonolayer oder Zellaggregate ein weiteres Störelement in die Versuchsanordnung bringt,nämlich ein unspezifisches Reservoir für Hormone und Pharmaka,welche an die Partikel adsorbiert werden.Unter diesen Umständen mag der impermeable Polypropylencarrier Biosilon in gleicher Funktion

benutzt werden. Wir haben jedenfalls bei unseren Experimenten mit Adriamycin fluoreszenzmikroskopisch keinerlei Akkumulation dieses eigentlich sehr kritischen Antibiotikums in den Mikrocarriern gesehen, ebenso keine unspezifische Adsorption von FITC- und RITC-markierten Antikörpern.

3. Die systematische Untersuchung der Zellbesetzungsdichte an Cytodex 1-Mikrocarriern sowie einige analoge Experimente an Cytodex 3 - Carriern im Vergleich zur besetzbaren Fläche haben als Flächenbedarf für differenzierte Herzzellen einen Wert in der Größenordnung von etwa 1000 μ^2 ergeben. Demzufolge sollten Herzmuskelzellkulturen für die Ausbildung eines echten Monolayers in keiner größeren primären Zelldichte als etwa 3 bis 4 x 10^4 Zellen/cm^2 explantiert werden, unter der Voraussetzung, daß wir - wie oben vorgegeben - eine reine Myoblastenpopulation im Wege der Dichtegradientenzentrifugation erhalten haben. Wir sind dagegen in der Regel bisher immer von Zelldichten der Größenordnung 3 x 10^5 Zellen/cm^2, also vom zehnfachen Überschuß ausgegangen. Einige wenige Vorversuche (Moser und Koke, unveröffentlicht) haben dann auch wirklich gezeigt, daß in der stationären Kultur 3 x 10^4 Zellen/cm^2 vollständig ausreichen, um nach 5 Tagen ein geschlossenes Monolayer reiner Myocyten zu bilden, wobei die zunächst voneinander vollständig unabhängigen Zellen einfach durch Größenwachstum bis zum Monolayer zusammenwachsen. Dies wird vor allem befördert durch Erhöhung des Glutaminspiegels im Kulturmedium von 2 auf 4 mM und durch die Vermeidung von Antibiotikazusätzen, wie im Rahmen der vorliegenden Arbeit ausgearbeitet (62). Weiter erwies sich, daß bei niedriger Explantationsdichte nahezu keine frei flottierenden "kleinen" Zellen übrig blieben, die normalerweise beim ersten Mediumwechsel entfernt werden. Dies ergänzt unsere Beobachtungen an Reaggregaten und zeigt die Entwicklungsfähigkeit der "kleinen" Zellen zu sessilen Myocytenformen. Insofern trägt diese Arbeit dazu bei, in aller Zukunft den Zellbedarf für primäre Myocytenkulturen um eine

Zehnerpotenz zu senken, sofern die Mitoseaktivität von Fibroblasten, wie oben gezeigt, durch Zusatz von 10^{-9} M Dexamethason niedrig gehalten und dadurch der Differenzierungszustand des Primärexplantats beibehalten wird.

4. In der stationären Kultur zeigt sich eine hohe Affinität zwischen Cytodex 3 -Carriern und Zellmonolayern, die dazu dienen kann, Zellmonolayer zu Muskelstreifen umzuformen, wie auf Seite 34 geschildert. Die beschriebene Aufrollung des Myocytenmonolayers rund um die inkorporierten Dextranpartikel führt entsprechend der veränderten Zugrichtung zu einer Umorientierung der Myofibrillen, wie bereits aus der erheblichen Verstärkung der Kontraktionskräfte ersichtlich.
Es hat eine große Zahl von Versuchen gegeben, aus isolierten Herzzellen orientierte Muskelstreifen zu züchten. Am erfolgreichsten waren die Experimente von De Haan et al. (23,60) die Muskelzellen in linearer Anordnung in Gräben aus Agar oder an Nylonfäden züchten konnten und diese Präparate für muskelmechanische und elektrophysiologische Versuche benutzen konnten. Das hier aufgezeigte Modell wird erlauben, den Übergang von der "unorientierten" Monolayerkultur zum "geordneten" Muskelzellstrang systematisch zu verfolgen, - wesentlich aussagekräftiger, als dies in der Skelettmuskelmonolayerkultur mit ihrer durch die Myoblastenfusionsrichtung vorgegebenen Faserrichtung möglich ist. Die Orientierung der Myofibrille in der Zugrichtung gehört zu den Grundeigenschaften der Herzmuskelzelle wie auch der glatten Muskelzelle, wobei in der glatten Muskelzelle durch die dynamische Umpolymerisation der Myosinfilamente diese Orientierung dynamisch erfolgt, während sie in der Herzmuskelzelle im Gewebeverband durch die Ausbildung quergestreifter Fibrillen festgeschrieben ist. Desorientierung von Herzmuskelfibrillen, wie sie bei vielen Kardiomyopathien beobachtet wird, muß dann nicht notorisch auf einem Defekt der myofibrillären Proteinstruktur beruhen, wie häufig postuliert (31), sondern ließe sich alternativ durch einen

Orientierungsverlust - oder einmal hypothetisch - Defekten im Bereich der Muskelansatzstellen erklären.Insofern biete das hier ausgearbeitete Verfahren zur Umorientierung eines Herzmuskelmonolayers zum Zellstrang bei geeigneter Modifikation möglicherweise ein Modellsystem zur kausalen Interpretation der Ätiologie bestimmter Kardiomyopathien an,das jetzt in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof.Pfitzer (Pathologie der Universität Düsseldorf) systematisch untersucht werden soll.

5. Eine ungeklärte Frage ist das mögliche Vorkommen des eigentlich im Herzmuskel nur für nicht - myogene Zellen charakteristischen Proteins Vimentin in singulären wie in aggregierten Myoblasten der Zellaggregationen.Experimente mit Antikörpern gegen Prekeratin zeigen ganz eindeutig,daß es sich hier nicht um eine unspezifische Anhäufung von Globulinen aufgrund der hohen Materialdichte der Zellen handeln kann;denn in diesen Experimenten waren die "kleinen" Zellen immer Prekeratin - negativ.Wir sind eher der Ansicht,daß diese Zellen sich zwischen dem im Skelettmuskel gut definierten Alphazustand und dem Betazustand der Myoblastendifferenzierung befinden (22,17), wobei sie untypischerweise bereits myofibrilläre Strukturen ausbilden,ohne dabei die Fähigkeit zu verlieren,das im Alphazustand noch vorhandene Vimentin zu synthetisieren.Darüberhinaus muß bedacht werden,daß Vimentin und das muskelspezifische Desmin der Intermediärfilamente eine gemeinsame Aminosäuresequenz besitzen,die hier für eine immunologische Kreuzreaktion verantwortlich sein könnte.Die Problematik ist in einer Veröffentlichung ausführlich diskutiert (27).

A b b i l d u n g s t e i l

Abbildungen 2 - 35

Abbildung 2 :

Bewuchs von verschiedenen Microcarriern nach 3-tägiger Rührkultur.

A Cytodex 1

B Cytodex 3

C Biosilon

Abbildung 3 :

Bildung von Reaggregaten definierter Größe nach Kultivierung von Herzzellen auf Cytodex

A Cytodex 1 bildet keine Reaggregate;das Zellmonolayer bleibt stabil.

B,C,D Bildung von Reaggregaten an Cytodex 3
Unter günstigen Bedingungen (siehe Text) erhält man häufig Reaggregate definierter Größe.

Abbildung 4 :

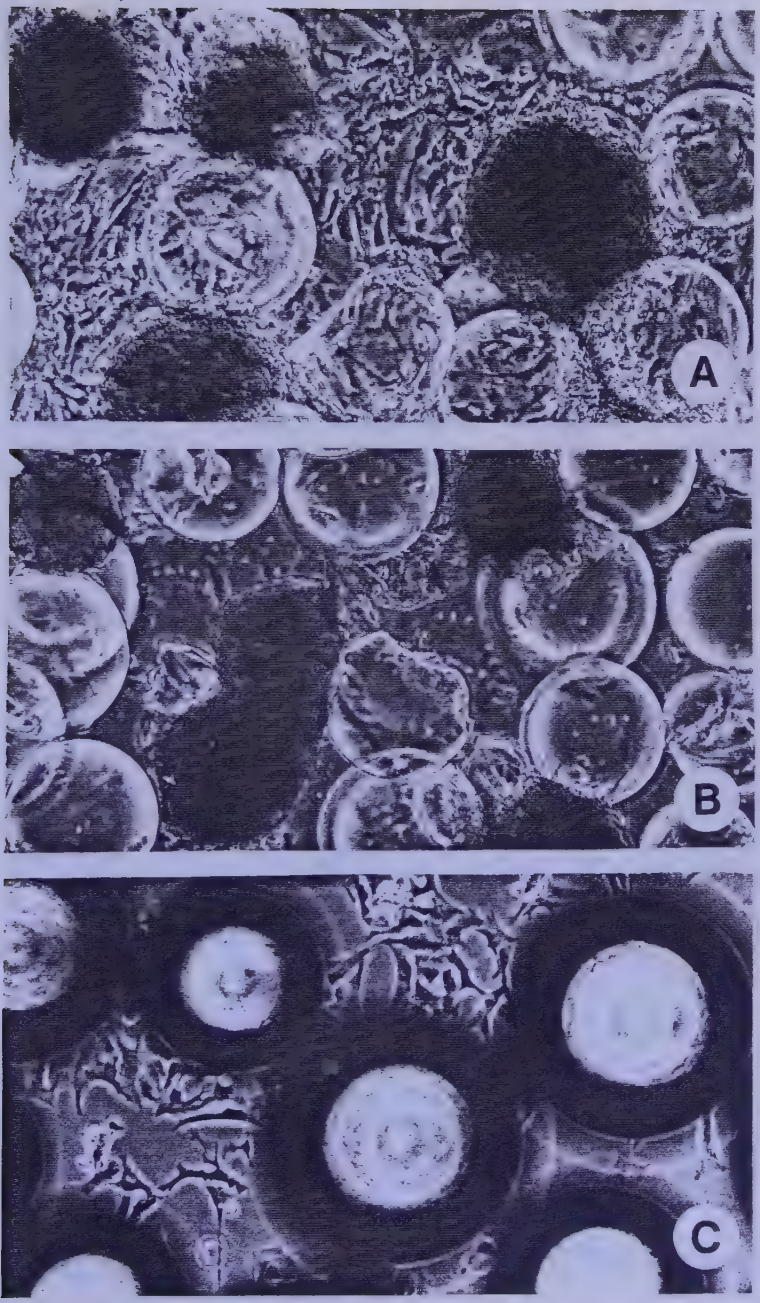
Besiedelung von Cytodex 1 - Microcarriern durch Herzzellen.

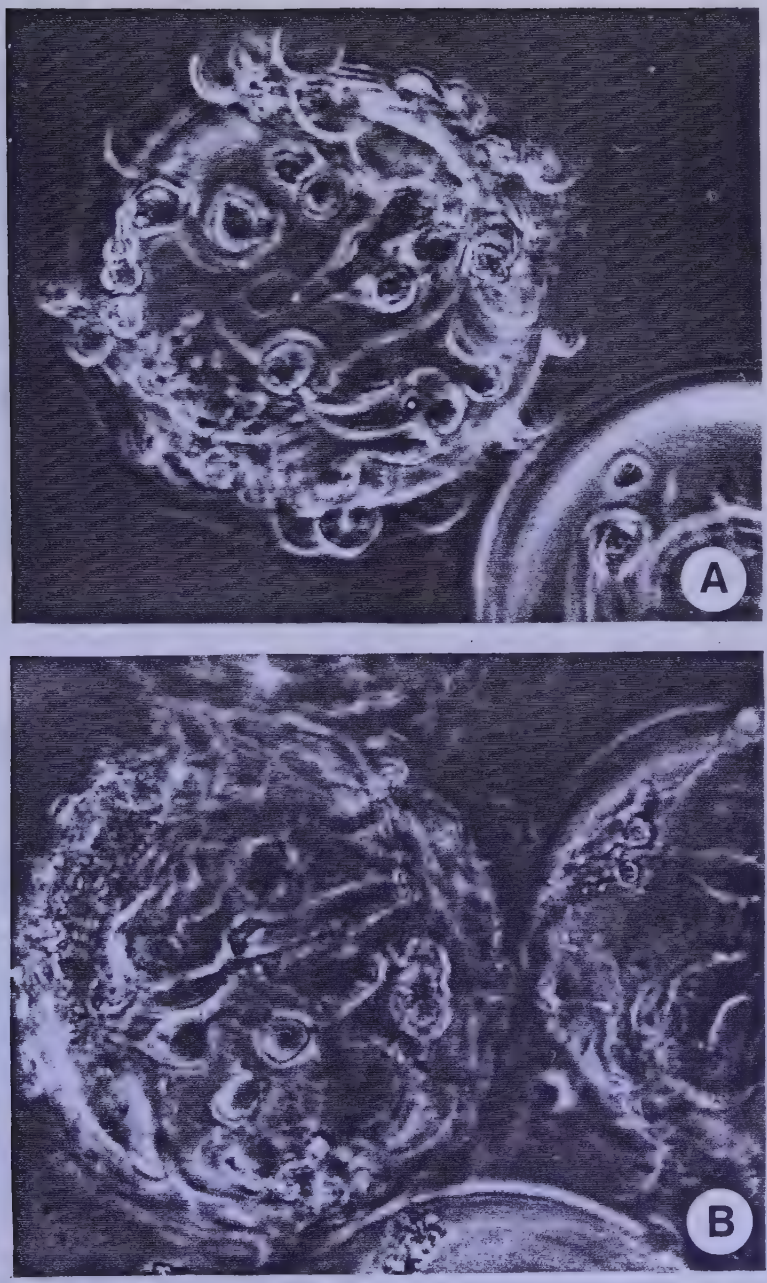
A Erster Kultivierungstag : Zellvermehrung

B Zweiter Kultivierungstag : Zellstreckung

Abbildung 5 :

Stabiles Zellmonolayer nach Übergang auf das kontinuierliche Rührprogramm.
Kleine mitotische Zellen in der Peripherie weisen auf weitere Zellvermehrung hin.

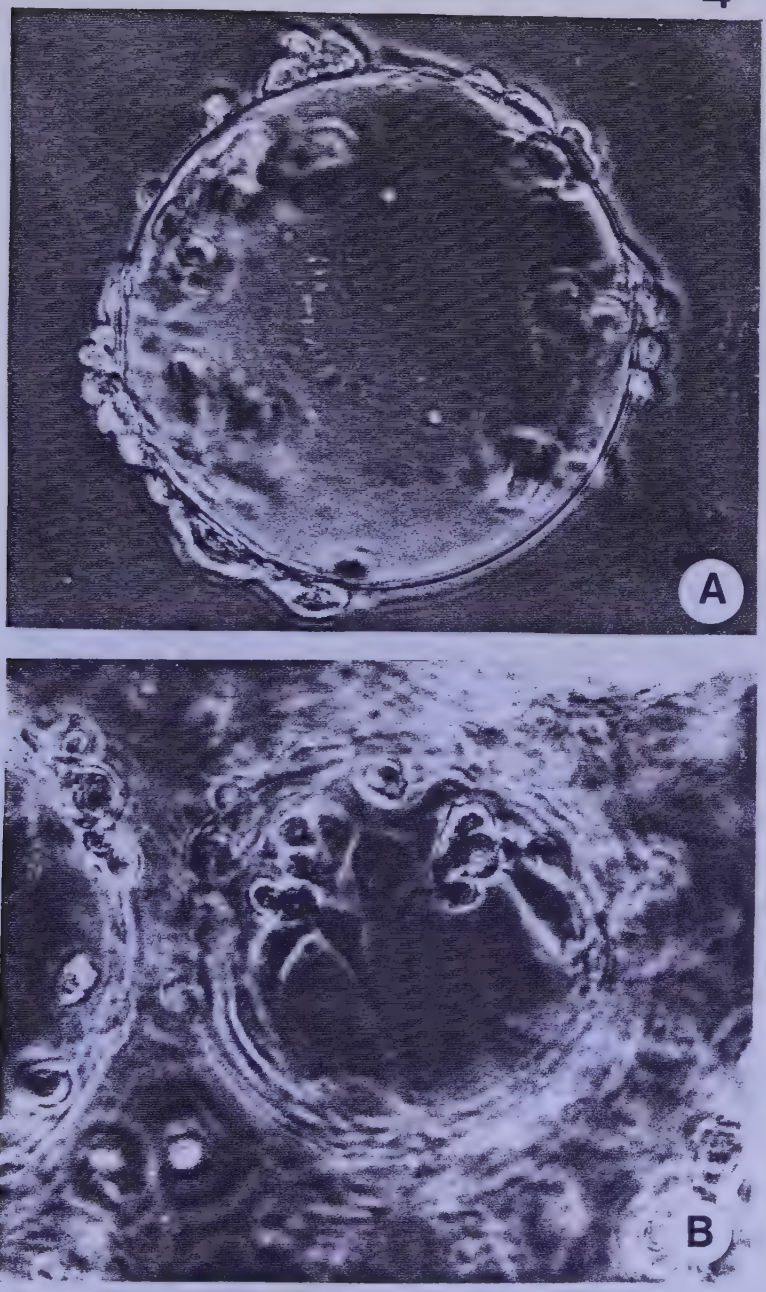

A
B
C


A
B

3

C

D


A
B

5

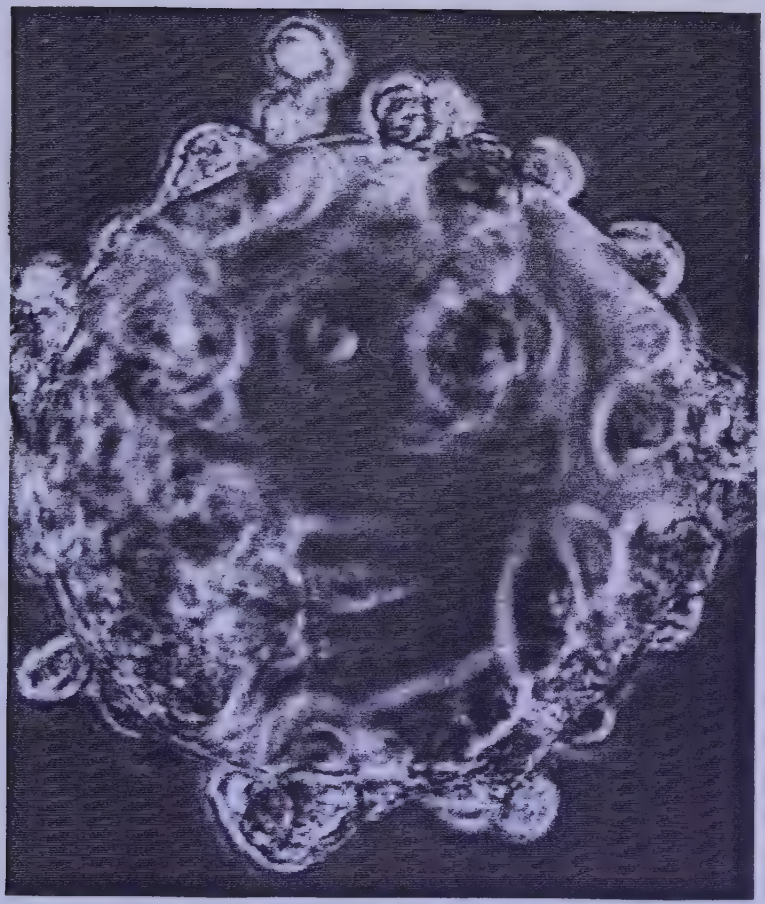


Abbildung 6 :

Besiedlungsverlauf auf dem Microcarrier Cytodex 1 als $\sum$% - Darstellung

A Diskontinuierliches Rührprogramm

B Kontinuierliches Rührprogramm

C Zellspreitung (siehe Text)

In A und B : offene Symbole = gespreitete Zellen; geschlossene Symbole = Gesamtzellen.
(% Kurven nach (3) ;jede Kurve entspricht 6oo Werten;aus (46)

Abbildung 7 :

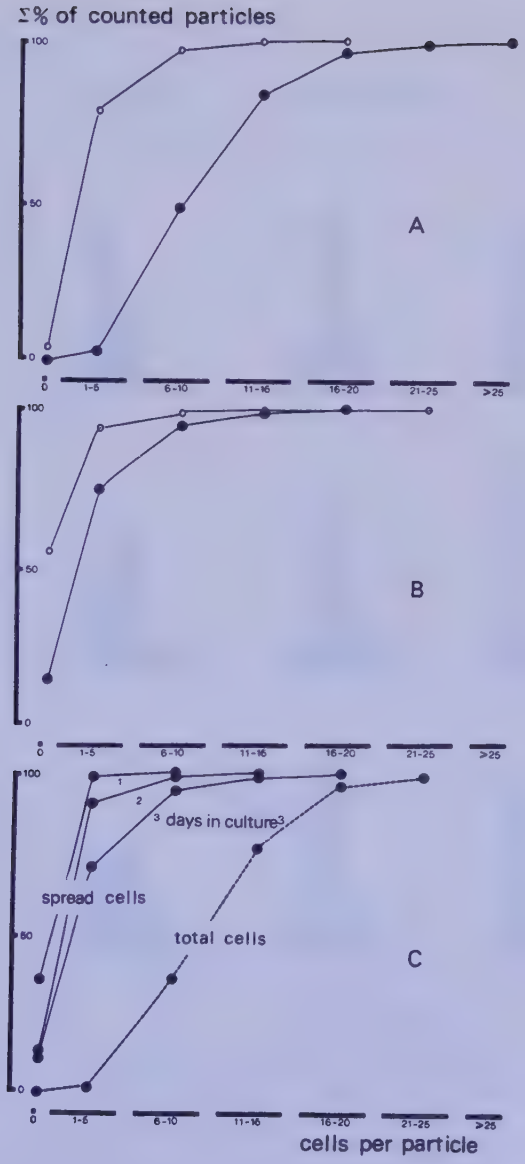
Besiedlungsverlauf auf dem Microcarrier Cytodex 1 als Rang - Histogramm.
An jedem Tag wurden 6oo Partikel ausgewertet.
Kommentare im Text.Aus (46);zur Auswertung siehe (3).

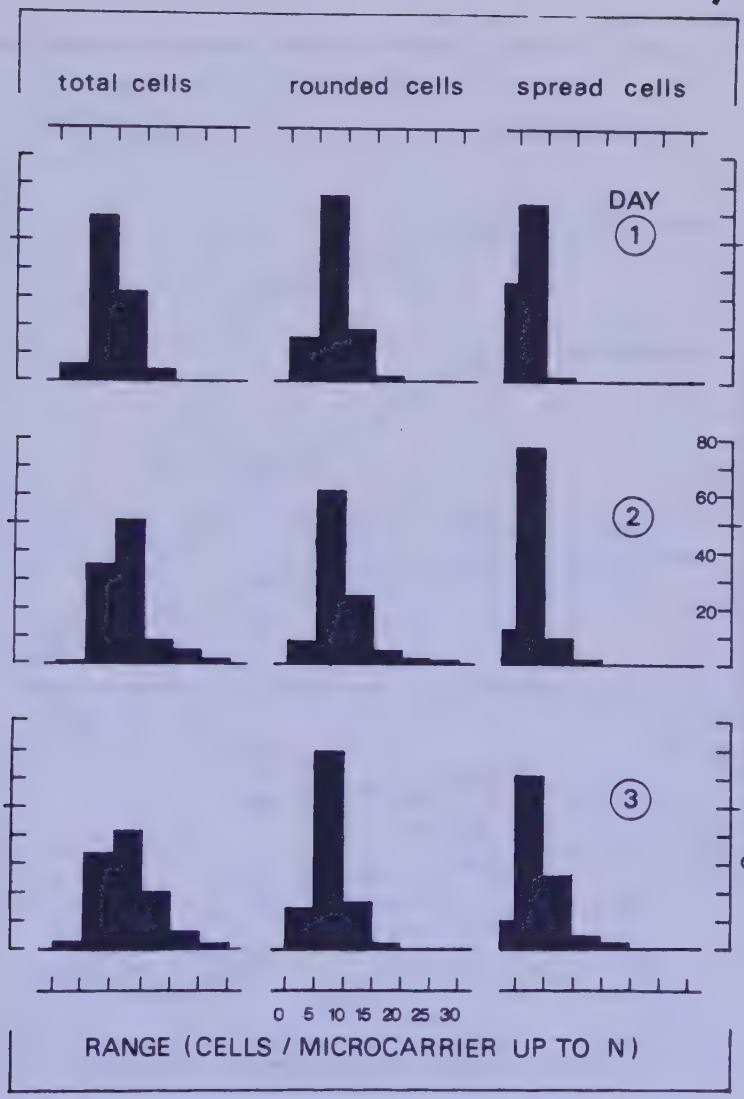
Abbildung 8 :

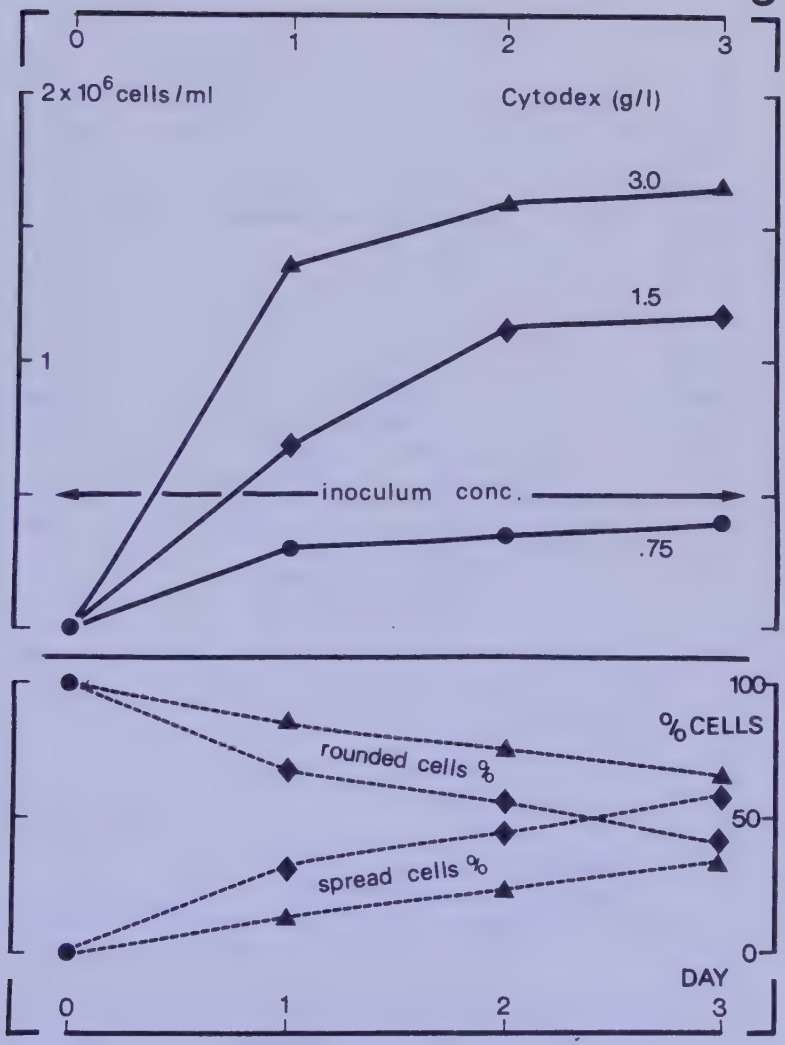
Zellvermehrung unter verschiedenen Konzentrationen des Microcarriers Cytodex 1;gezählt wurden (oberer Teil der Abb.) die auf den Microcarriern angewachsenen Zellen,wobei für 1.5 und 3.o g/l Cytodex (unterer Teil der Abb.) für abgerundete und gespreitete Zellen normiert wurde.Weitere Erklärungen siehe Text.

Abbildung 9 :

Zellbewuchs und Flächenverteilung auf Cytodex 1 : Auszählung von 2oo Partikeln in 11 Größenklassen.
Schwarze Symbole : Gesamtzellen
Offene Symbole : gespreitete Zellen
Große Symbole : Schwerpunkte der Korrelationsgeraden
Histogramm : Mittlere Fläche von 2oo Partikeln in 9 Größenklassen.
Auswertung nach (3);weitere Kommentare siehe Text.


Σ% of counted particles
100
50
0
A
0
1-5
6-10
11-16
16-20
21-25
>25
B
1
2
3
3 days in culture
spread cells
total cells
C
cells per particle


total cells
rounded cells
spread cells
DAY
1
2
3
80
60
40
20
% OF MICROCARRIERS IN RANGE
0 5 10 15 20 25 30
RANGE (CELLS / MICROCARRIER UP TO N)


0
1
2
3
2 x 10^6 cells / ml
Cytodex (g/l)
3.0
1.5
1
inoculum conc.
.75
100
% CELLS
rounded cells %
50
spread cells %
0
DAY
0
1
2
3

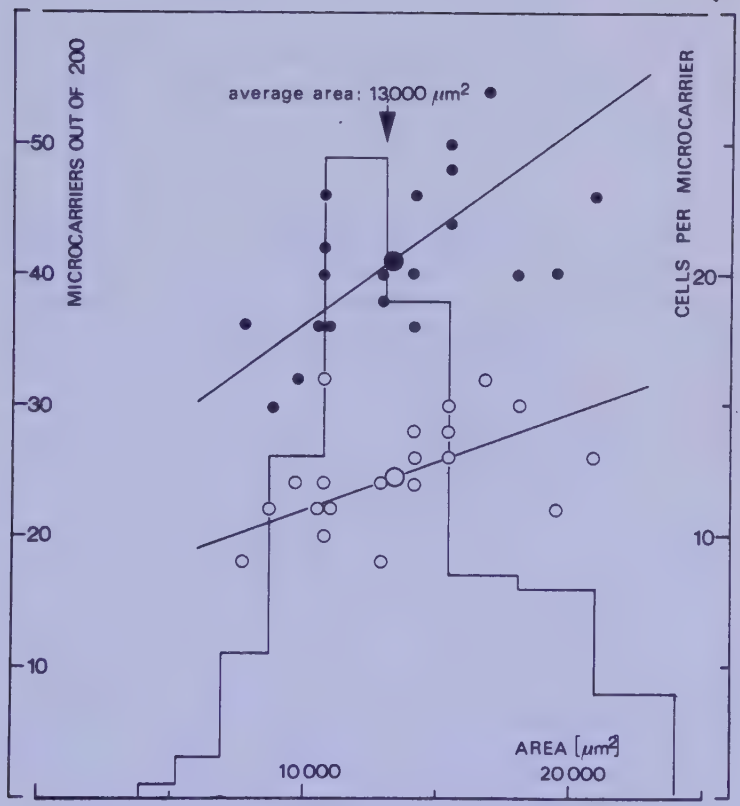

average area: 13000 μm²
MICROCARRIERS OUT OF 200
CELLS PER MICROCARRIER
50
40
30
20
10
20
10
10 000
AREA [μm²]
20 000

Abbildung 1o :

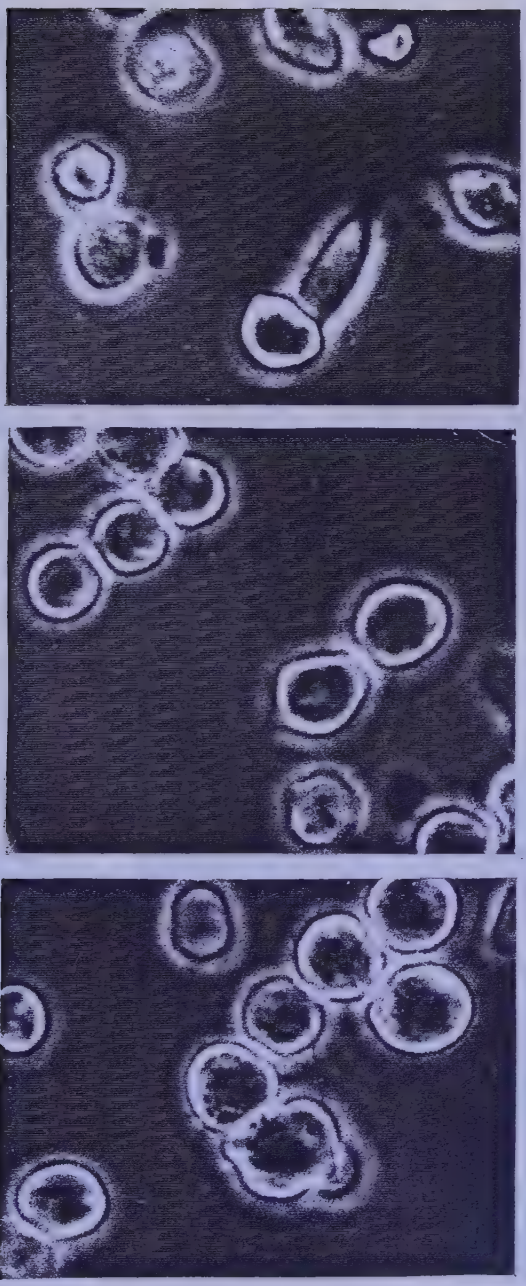
Nachweis der Mitoseaktivität in Myoblastenkulturen nach 3-tägiger intermittierender Rührkultur. Wenigstens eine der Tochterzellen zeigte Spontankontraktionen während der Mitose.

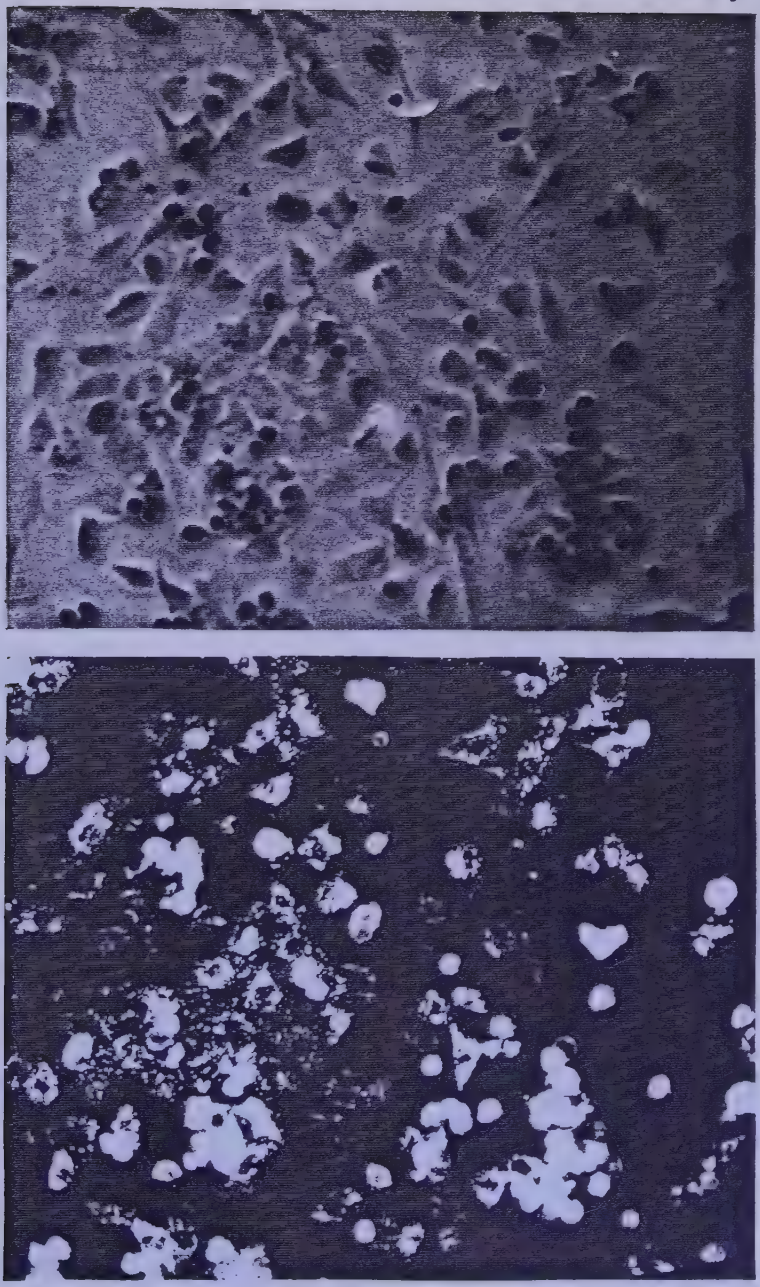
Abbildung 11 :

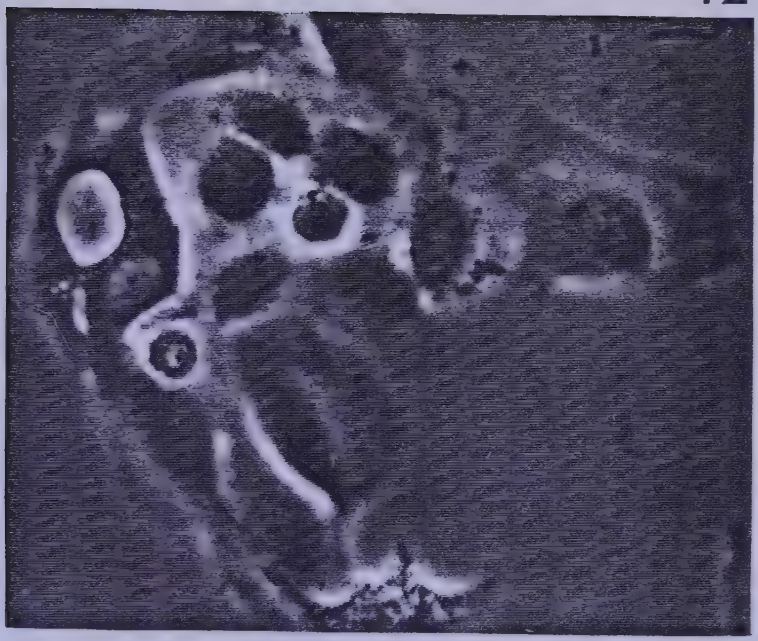
Akkumulation von Adriamycin in Muskelkernen nach Vorkultur auf Cytodex 3. Vergleich von Phasenkontrast - und Fluoreszenzbild.

Abbildung 12 :

Akkumulation von Adriamycin in Muskelkernen nach Vorkultur auf Cytodex 3.
3o Minuten nach Inkubation sieht man im Phasenkontrast (oben) deutlich den kardiotoxischen Effekt.







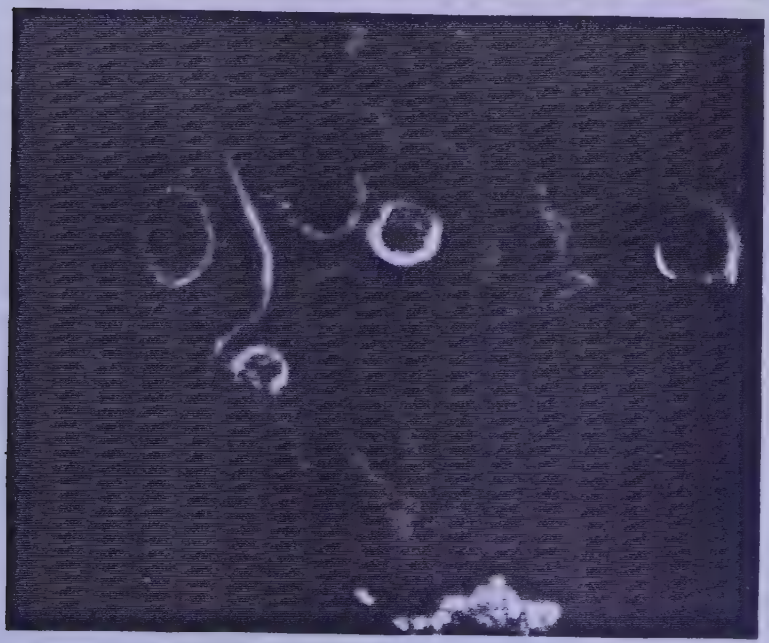
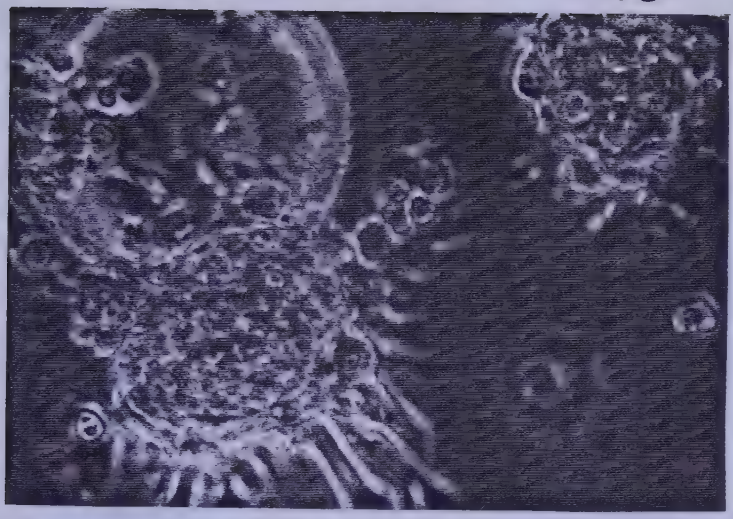


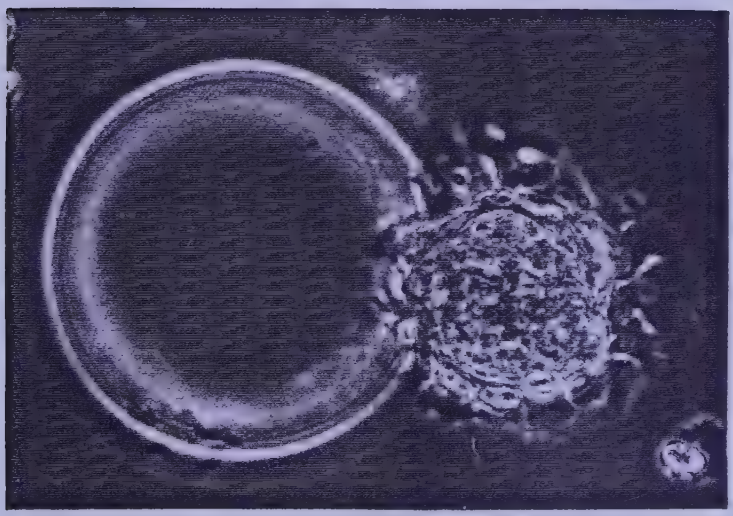
Abbildung 13 :

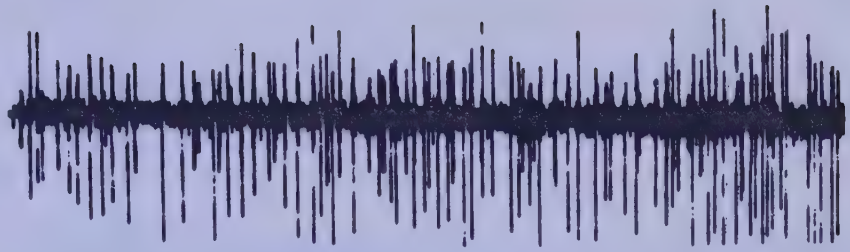
Zellaggregate im Kontakt mit Cytodex 3 - Partikeln (vergleiche auch Abb.3).

Abbildung 14 :

Kontraktionsaktivität von Zellmonolayern auf Cytodex 1 (A,B) und von Zellreaggregaten in Kontakt mit Cytodex 3 (C,D).







1 min

A

B

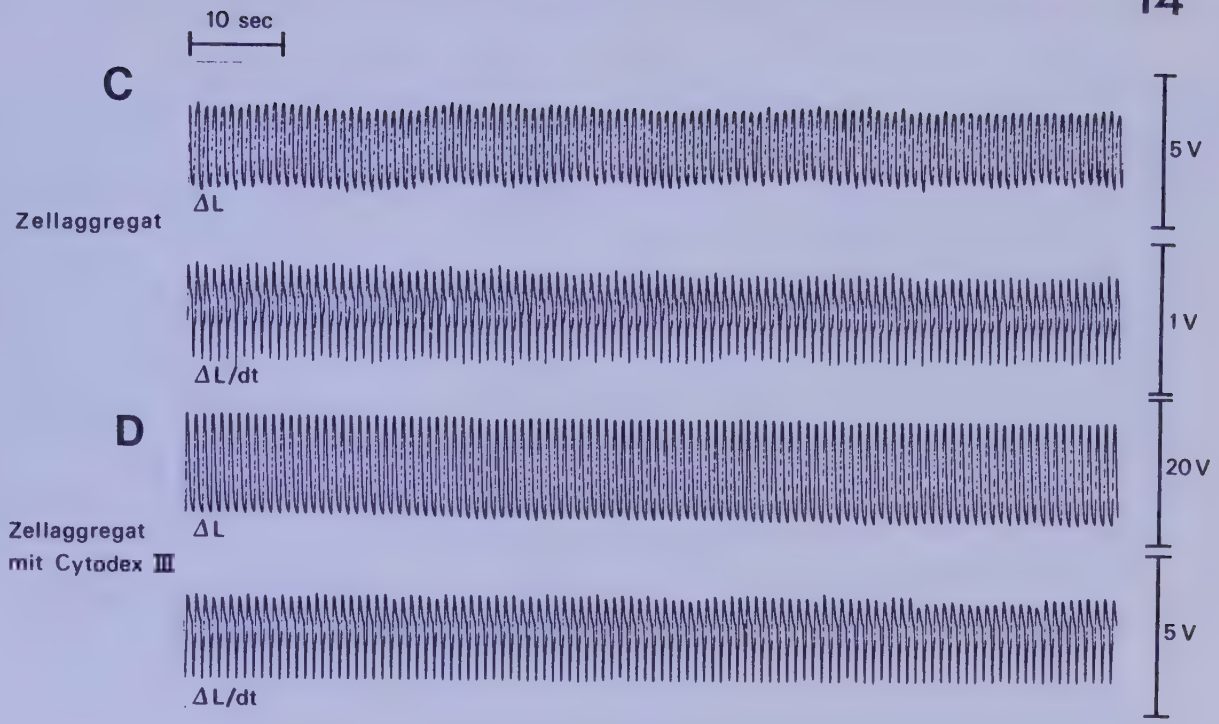

10 sec
C
5 V
ΔL
Zellaggregat
1 V
ΔL/dt
D
20 V
Zellaggregat
mit Cytodex III
ΔL
5 V
ΔL/dt

Abbildung 15 :

Unterschiedliche Wuchsformen von

Mischzellreaggregat (A) und

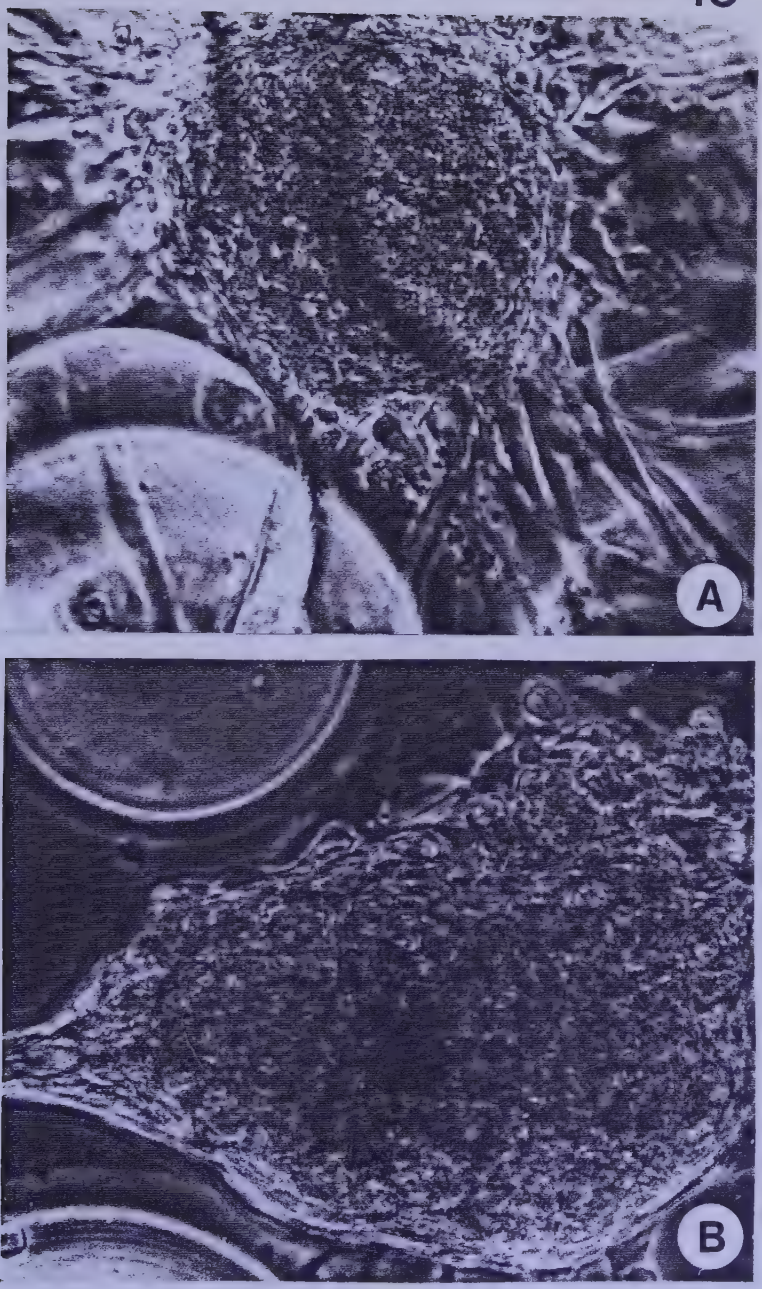
Myoblastenreaggregat (B)in Kontakt mit Cytodex 3 - Partikeln.

Abbildung 16 :

Einfluß von Dexamethason ($1o^{-9}$M) auf die Zellentwicklung.

A ohne Dexamethason

B mit Dexamethason


A
B

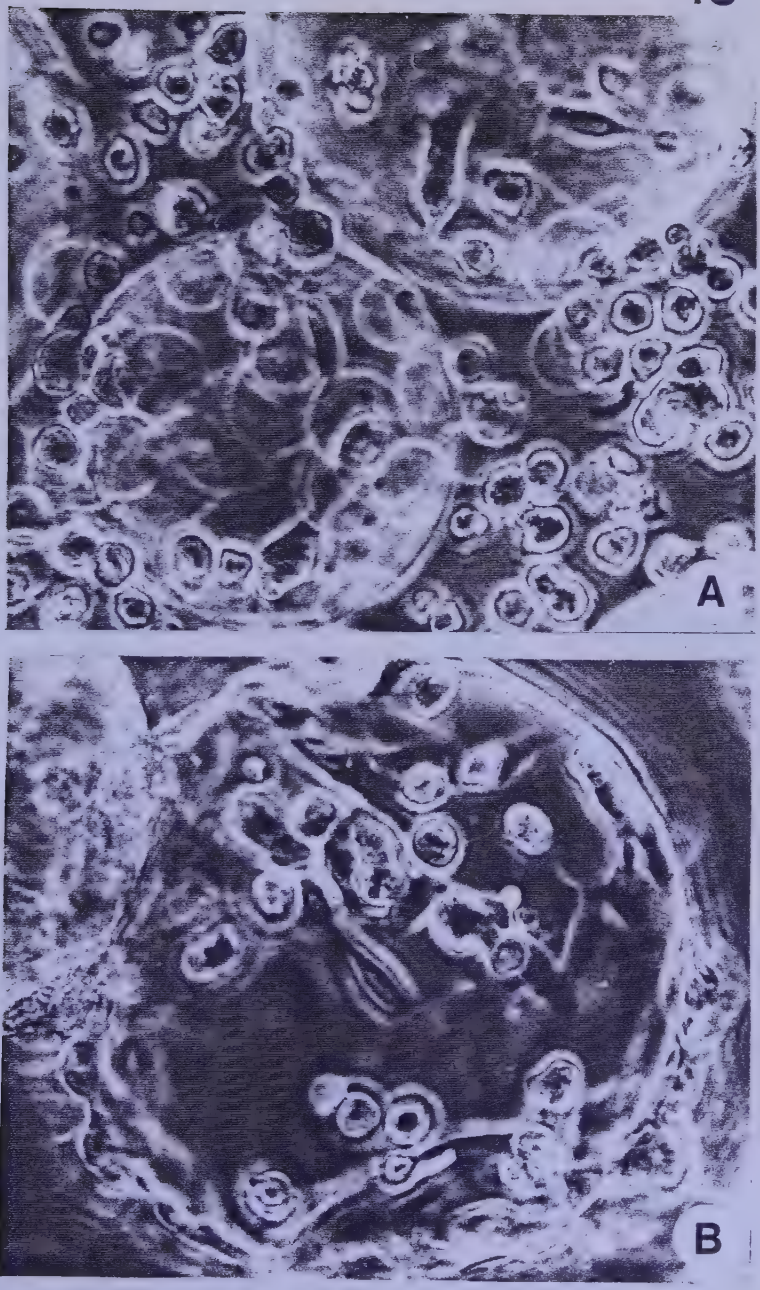

A
B

Abbildung 17 :

Prinzip der Bildung eines Reaggregats aus einem Mischzellmonolayer.Erklärung im Text.

Abbildung 18 :

Inkorporation von Cytodex 3 - Partikeln in Myoblasten - Monolayer und Ausbildung von Muskelstreifen.Durch Zusammenrollen des Monolayers bildet sich ein Schlauch,der unter Umorientierung der Zellen in Zugrichtung zum Muskelstreifen wird.

Abbildung 19 :

A Ansatz eines Muskelstreifens und

B Parallelorientierung der Muskelzellen

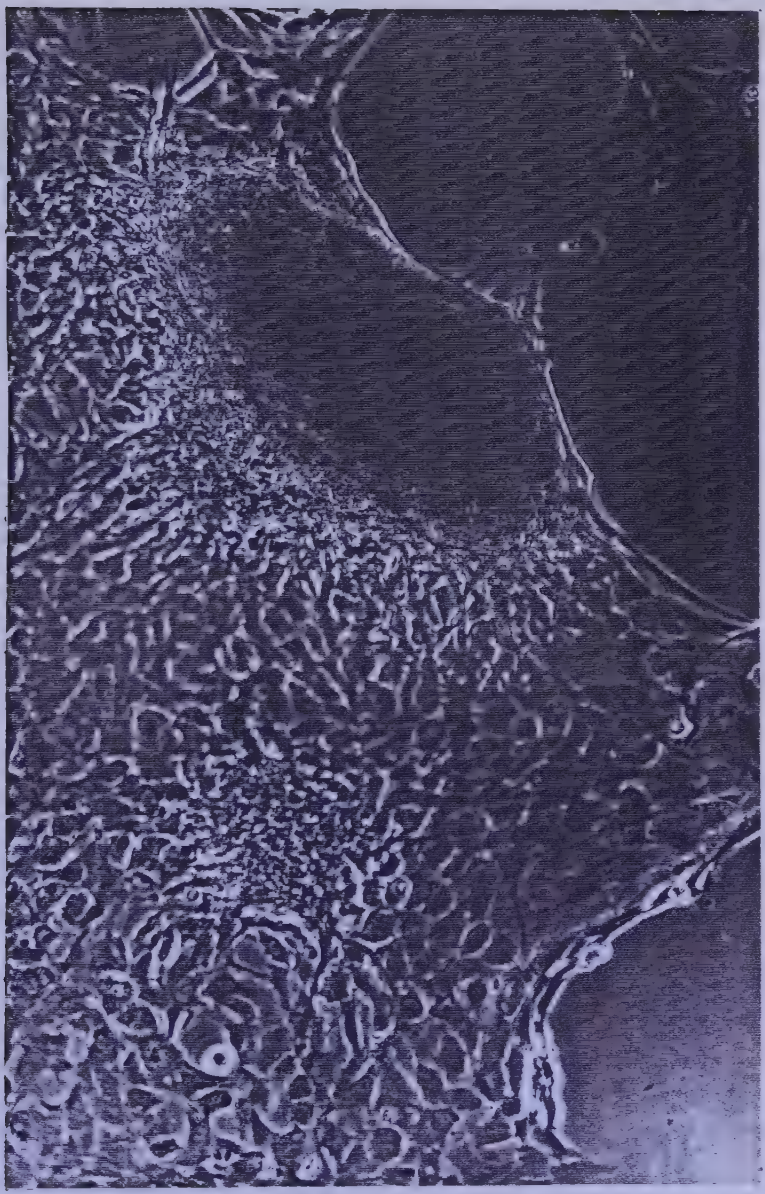
Abbildung 2o :

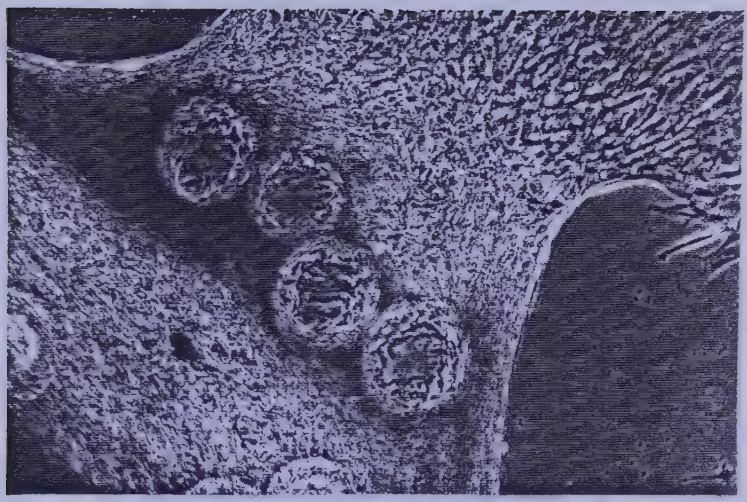
Fluoreszenzimmunologischer Nachweis von Myosin in ausgerichteten Teilen eines Zellmonolayers nach Inkorporation von Cytodex 3 - Partikeln.
Im oberen Teil der Abbildung ist die Querstreifung der Myofibrillen im Phasenkontrast sichtbar.Der eingezeichnete Ausschnitt zeigt im unteren Teil der Abbildung die Myosin - Immunfluoreszenz.Sandwichtest mit anti - Myosin--Ig G der Ratte und FITC - markierten anti - Ratten Ig G vom Kaninchen.

Abbildung 21 :

Nachweis von Desmoplakin (A) und

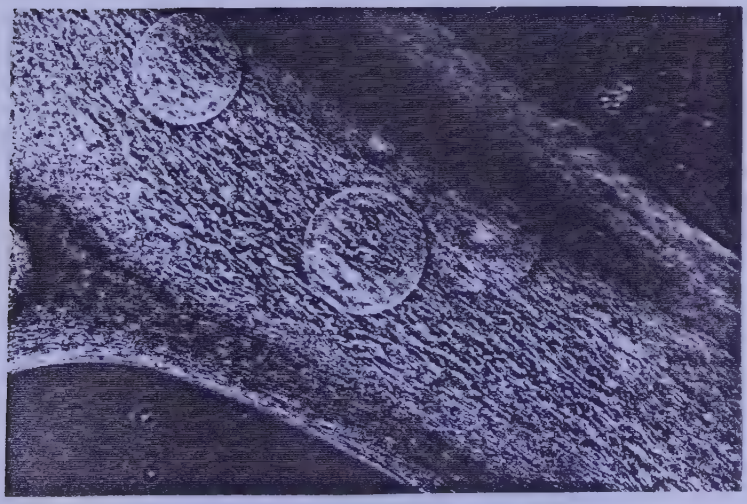
Desmin (B) mit fluoreszenzimmunologischer Methodik in einem Explantat von Cytodex 3 unter $1o^{-9}$M Dexamethason.



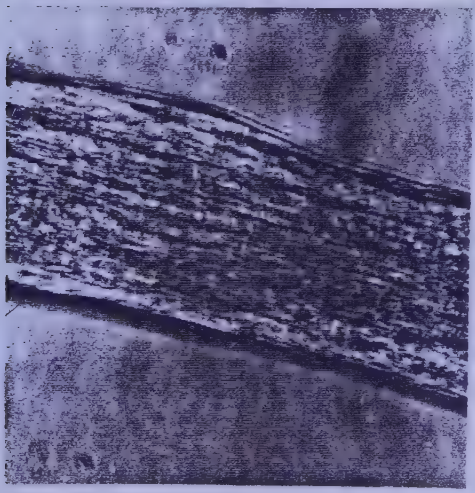


A

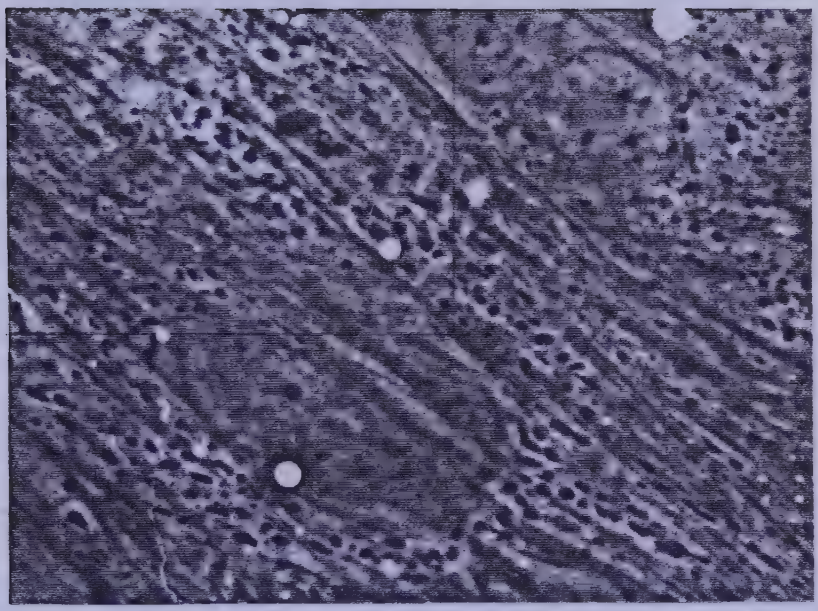
B

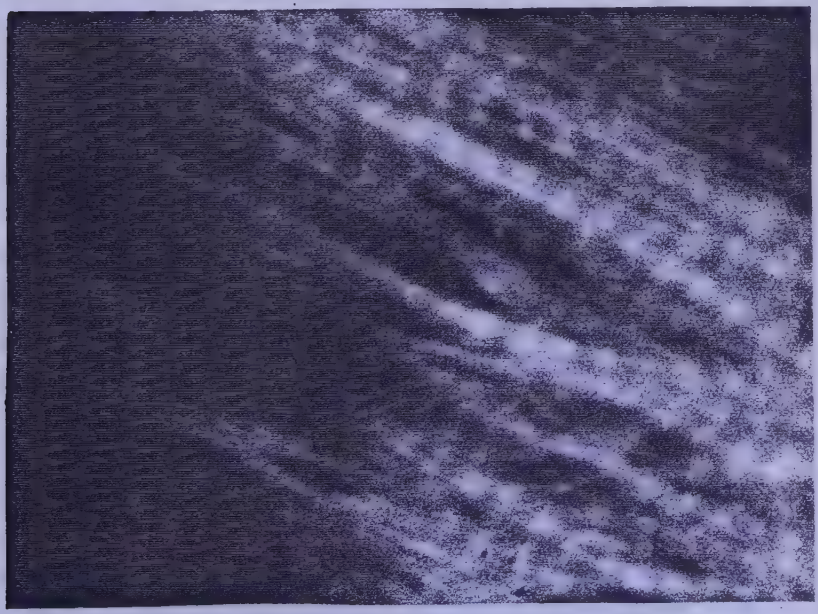


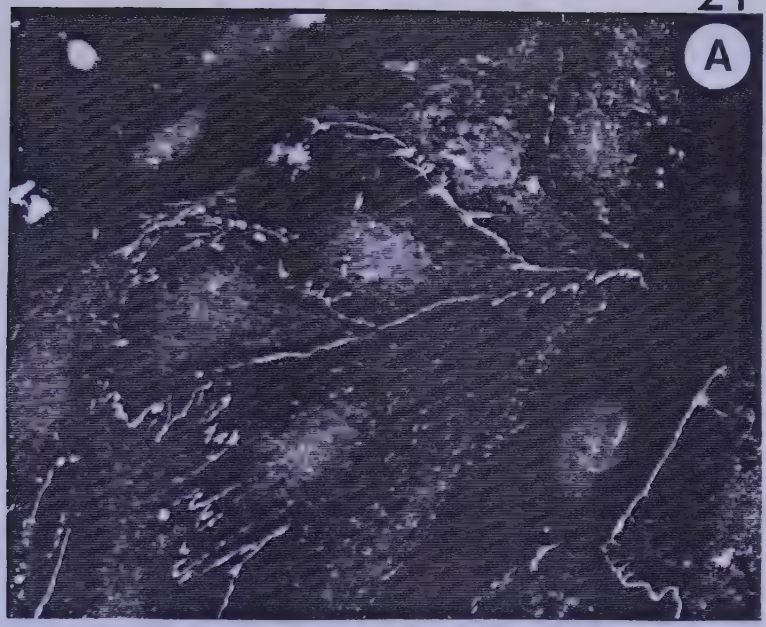
A



B






A

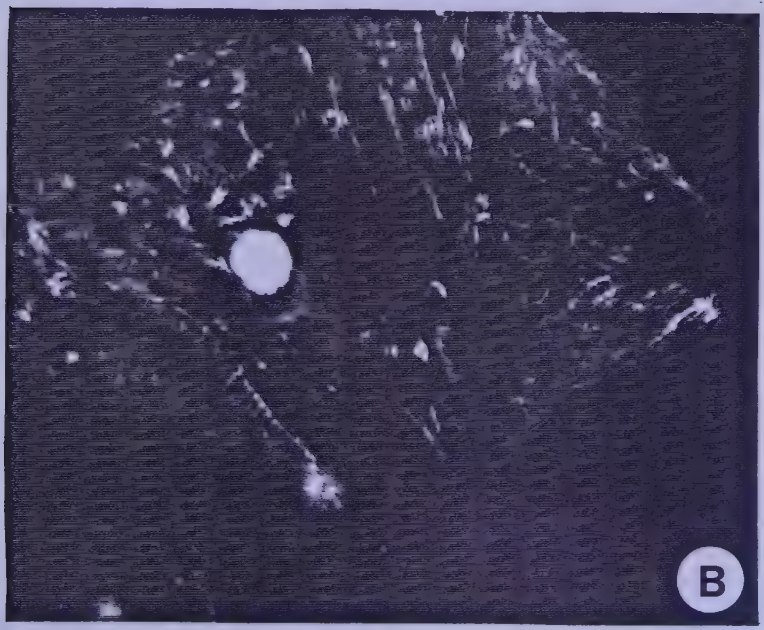
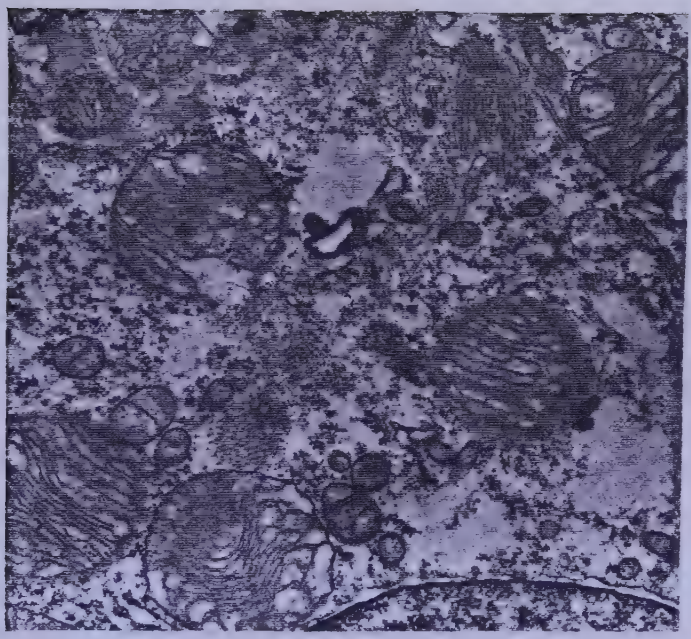

B

Abbildung 22 :

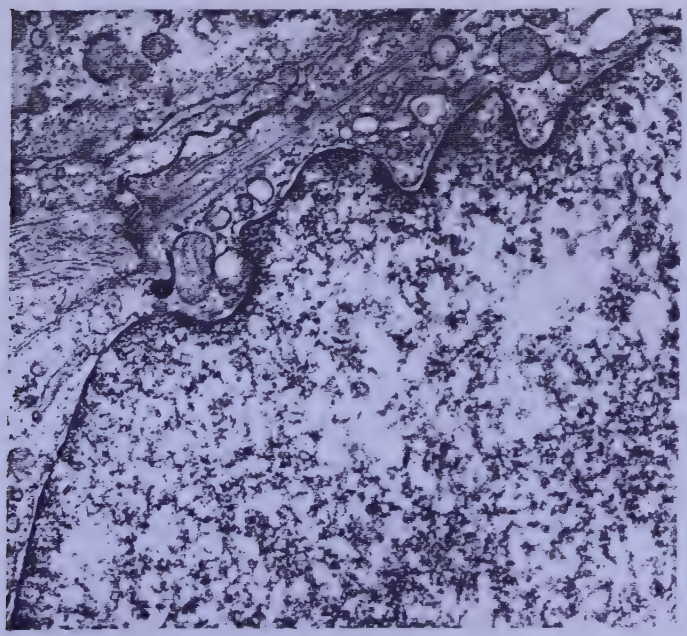
Wichtige Zellorganellen : Mitochondrien
Die Mitochondrien liegen in großer Häufung in der Nähe der Kerne und eingebettet zwischen Myofibrillenquerschnitten. Auffällig sind die sehr unterschiedlichen Durchmesser ihrer Querschnitte.In unseren Präparaten finden sich häufig Lipidaggregationen sowohl in peripheren als auch zentralen Zellen (Bildmitte),die sich aus dem Vergleich aus verschiedenen Stadien des Mitochondrienzerfalls ergeben.Der gute Erhaltungszustand der meisten Mitochondrien läßt darauf schließen, daß es sich bei diesen Restprodukten des Mitochondrienzerfalls nicht um Fixierungsartefakte handelt.

Abbildung 23 :

Wichtige Zellorganellen : Zellkerne und Golgi - Apparat
In den meisten Zellen zeigen die Kerne eine starke Lappung, in deren Bereich sich oft eine Ansammlung elektronenoptisch leerer kleiner Vesikel befindet,die wir als Golgi-Apparat deuten.Vesikeln gleicher Größe finden sich nur ganz selten im Bereich von breiteren Myofibrillen,wo wir sie als ein gering entwickeltes longitudinales sarkoplasmatisches Retikulum deuten (siehe Abb.29 B).



22



23

Abbildung 24 :

Wichtige Zellorganellen : Polysomen
Polysomen liegen sowohl frei wie auch in vielen Fällen in unmittelbarer Nachbarschaft und innerhalb der Myofibrillen (Abb. 29).Darüberhinaus zeigt die Abbildung einen der häufig auftretenden "multi - vesicular bodies" (MB).

Abbildung 25 :

Membrandifferenzierungen : Intercalated disc
Die stark ineinander verzahnten Myoblasten der Aggregate zeigen Ausbildungen einer glanzstreifenähnlichen Struktur, in der sich alle bekannten Typen von spezialisierten Zellverbindungen finden,besonders ausgeprägt die hier gezeigte Desmosomenstruktur (D),die für die Verbindung zwischen typischen Herzmuskelzellen charakteristisch ist (12,72).

Abbildung 26 :

Differenzierungen des intercalated disc.

A Zonula adhaerens

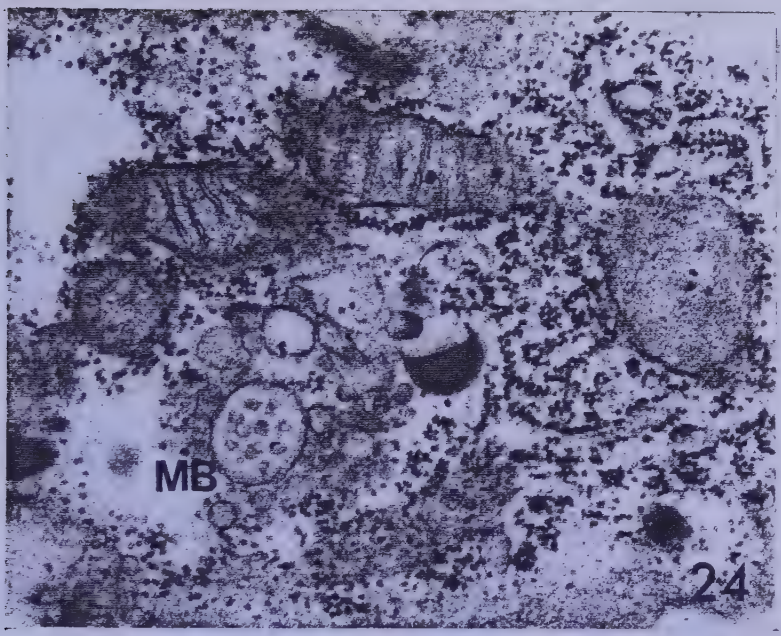
B Desmosom

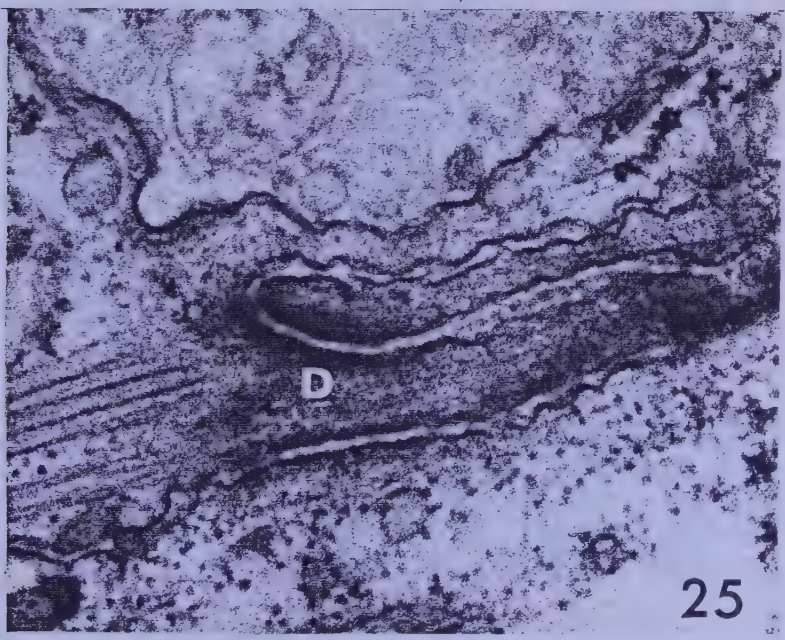
C Gap junction

Der Teil B der Abbildung zeigt einen Tangentialschnitt durch ein Desmosom mit Darstellung der anhängenden Desminfilamente.

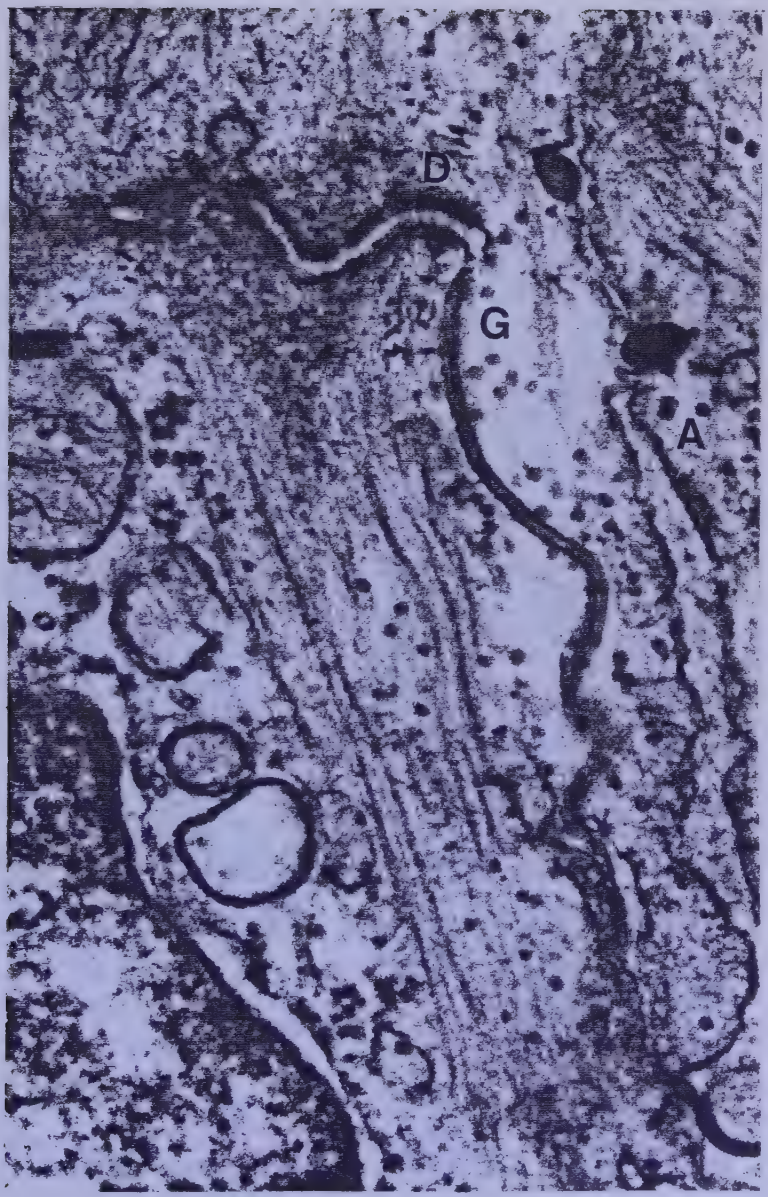
Abbildung 27 :

Basale Region eines Zellreaggregats
Nur im Transversalschnitt der Zellreaggregate finden sich weitläufige Myofibrillenstränge,die entsprechend der Zugrichtung oft über lange Strecken parallel orientiert sind. In diesem basalen Bereich sieht man auch Querschnitte durch T - Tubuli (T) und häufig die lipoiden Zerfallsprodukte langgestreckter Mitochondrien (M'),wie in Abb. 22 beschrieben.

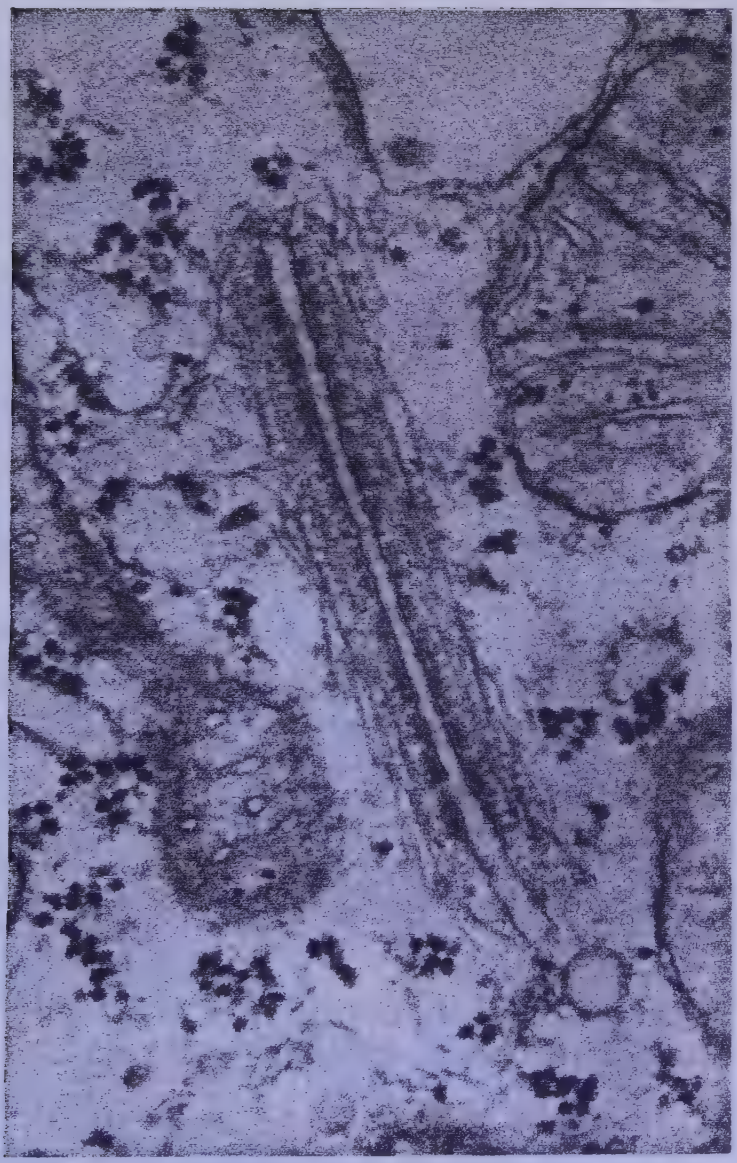

MB
24


D
25

26 A



26 B



T
M'
M'

Abbildung 28 :

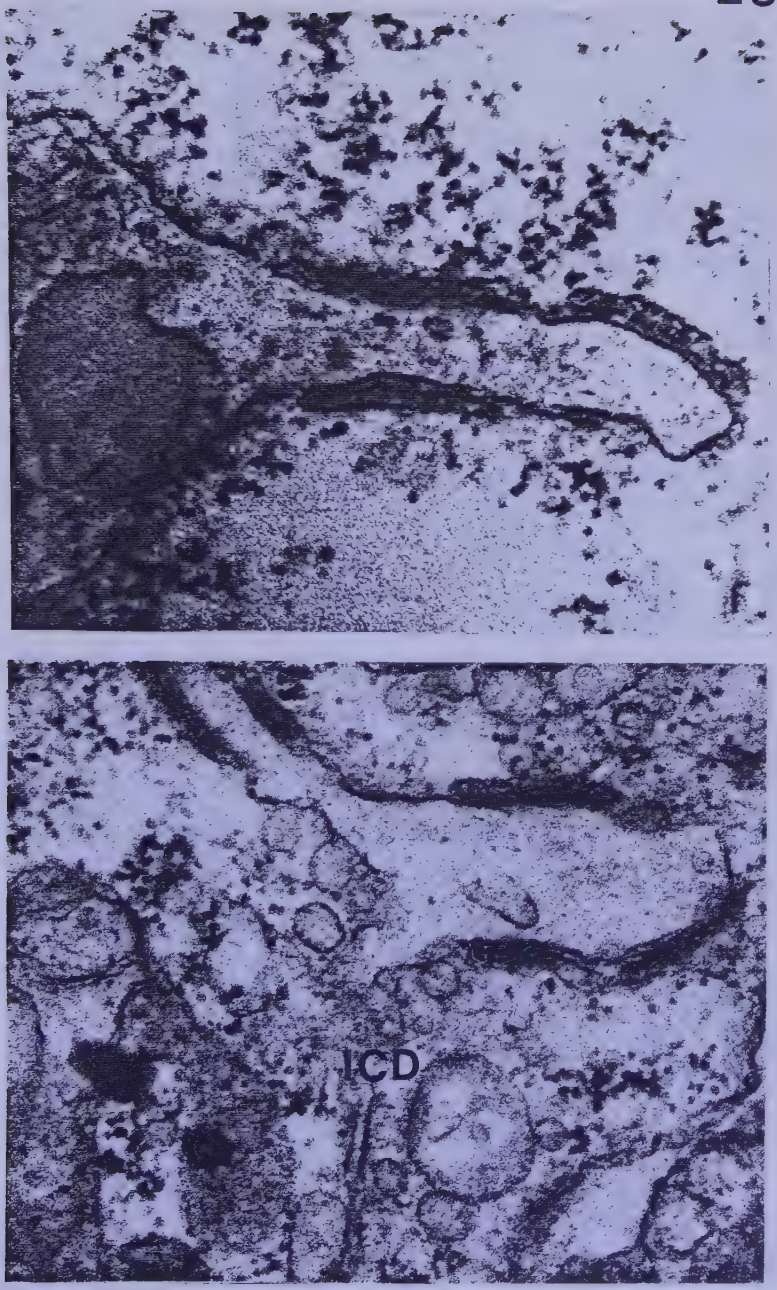
Längsschnitte durch T - Tubuli
An die zellinterne Wand der T - Tubuli sind in regulären Abständen "kollabierte" Vesikel angelagert,die insgesamt mit der Wandung des T - Tubulus trilamelläre Strukturen ergeben,welche wir als Dyadenäquivalent deuten.
Wie der untere Teil der Abbildung zeigt,gibt es offenbar Verzweigungen der T - Tubuli und Übergänge zwischen T - Tubulus und intercalated disc.

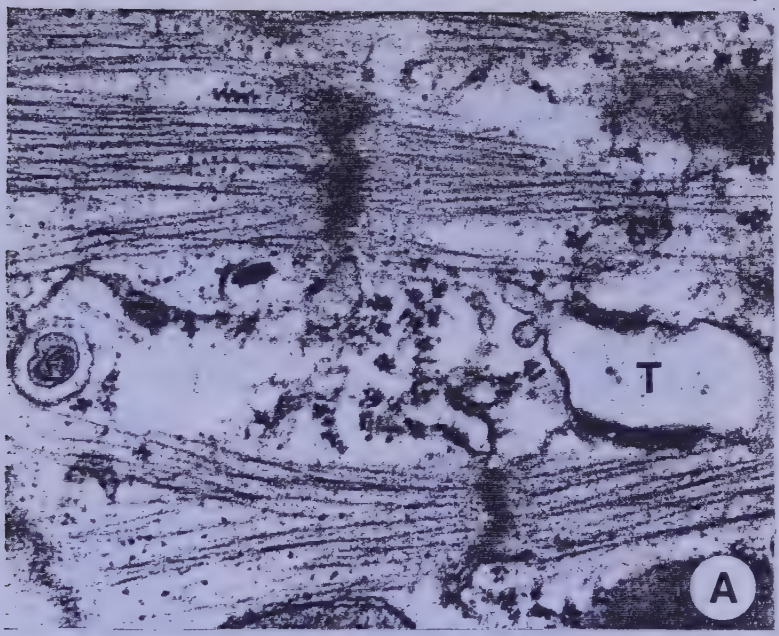
Abbildung 29 :

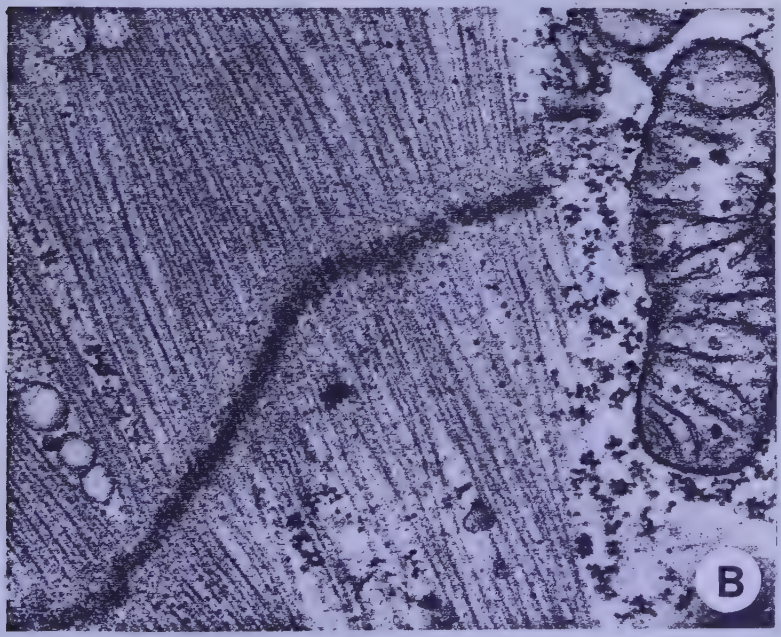
Sarkoplasmatisches Retikulum
Der obere Teil der Abbildung (A) zeigt einen Ausschnitt aus Abbildung 27.Auffällig ist die aberrante Orientierung des T - Tubulusquerschnitts zur Myofibrillenrichtung : Die Dyadenstruktur liegt parallel zur Myofibrillenrichtung und nicht im Register mit dem Z - Band,obgleich eine direkte fibrilläre Verbindung zum Z - Band dargestellt werden kann.Der T - Tubulus zeigt weiter vesikuläre Einstülpungen, die möglicherweise als Pinocytose - Vesikel gedeutet werden können.
Abbildungsteil B zeigt einen breiteren Myofibrillenzug mit Vesikeln des longitudinalen Systems aus dem basalen Teil eines Reaggregats.Man vergleiche die unterschiedlichen Erhaltungszustände der Cristae mitochondriales des abgebildeten Mitochondriums mit den Abbildungen 22 und 24.

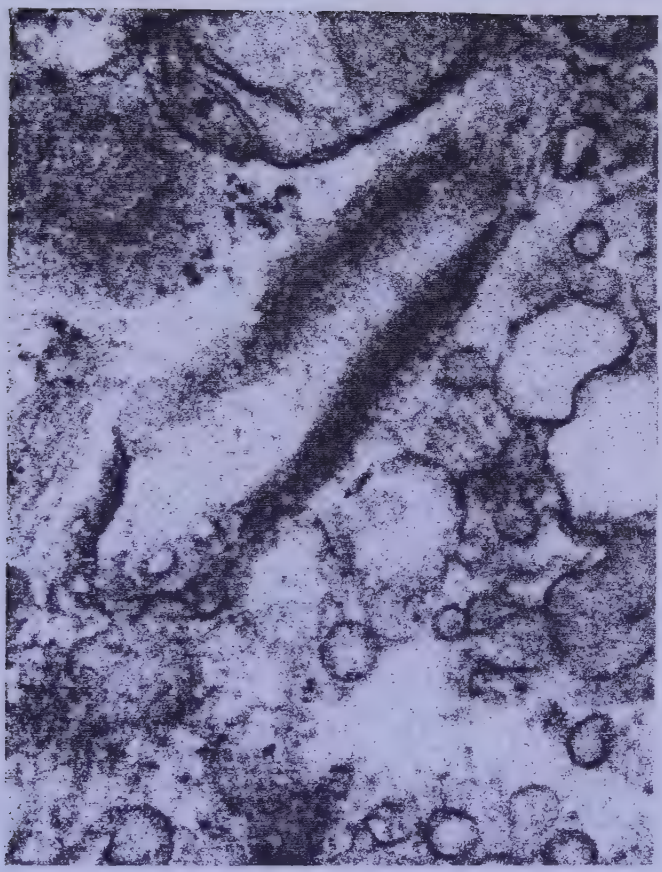
Abbildung 3o :

Schrägschnitt durch eine T - Tubulusstruktur.
Man erkennt deutlich den Aufbau der kollabierten Vesikelmembranen aus größeren periodischen Untereinheiten.


ICD


T
A


B



30

Abbildung 31 :

T - Tubulus - artige Strukturen im Zuge eines intercalated disc im basalen Teil eines Reaggregats.Die trilamelläre Struktur,die normalerweise für T - Tubuli charakteristisch ist, kann gleichermaßen in die Membrandifferenzierungen eines intercalated disc eingebunden sein,liegt auch hier parallel zur Myofibrillenrichtung und ist deutlich verschieden von der benachbarten Desmosomenstruktur (D).Die bereits in Abbildung 29 gezeigten mutmaßlichen Pinocytose - Vesikel liegen hier der trilamellären Struktur gegenüber.Offenbar sind die Pinocytose-Vesikel zur Abschnürung befähigt (V) und haben die gleiche Größe wie die in Abbildung 29 B gezeigten Vesikel des longitudinalen sarkoplasmatischen Retikulums.
O Zellaußenraum
I Zellinnenraum

Abbildung 32 :

Triadenstrukturen in peripheren Zellen von Myoblastenaggregaten. Im peripheren Teil der Myoblastenreaggregate sind die typischen trilamellären Strukturen des T - Tubulus ohne Anzeichen einer Einstülpung häufig als Doubletts,seltener als Singuletts vorhanden.der obere Teil der Abbildung zeigt einen deutlich mit Proteinpräzipitaten gefüllten weitlumigen Kanal des Zellaußenraums (K).

Abbildung 33 :

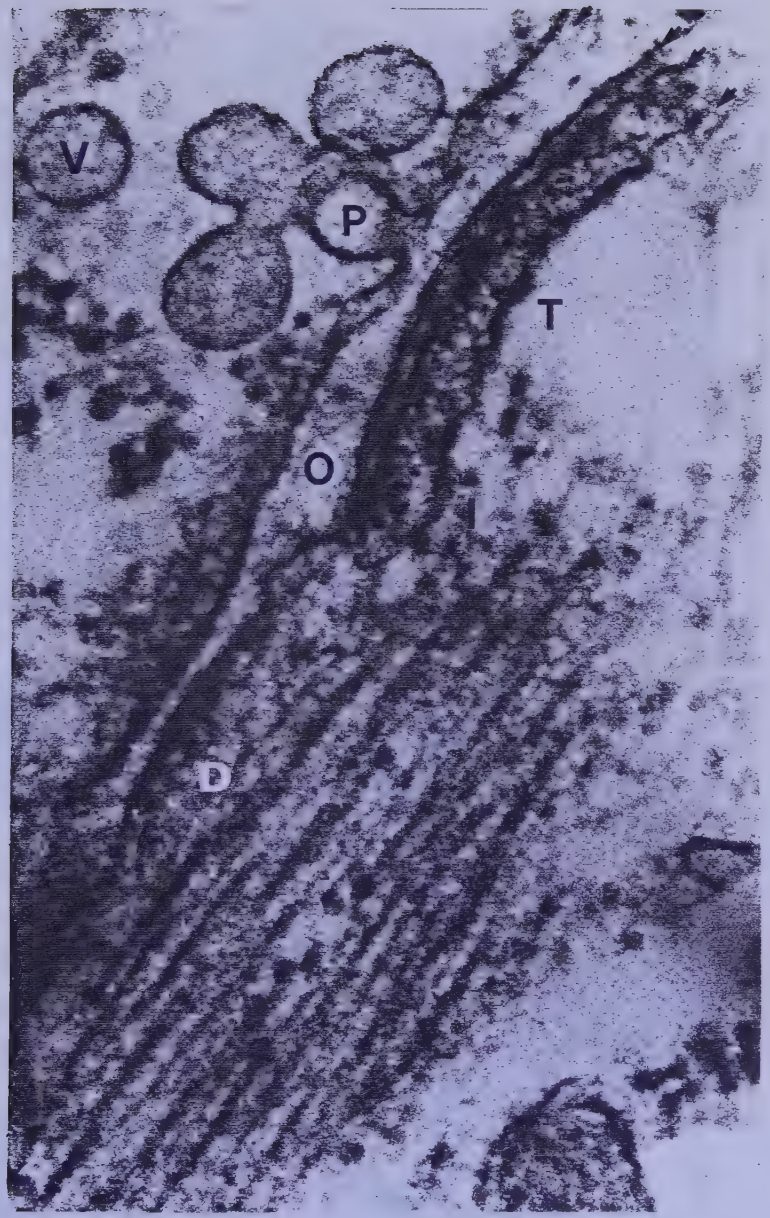
Triadenstrukturen zwischen Zellen von Myoblastenmonolayerkulturen.

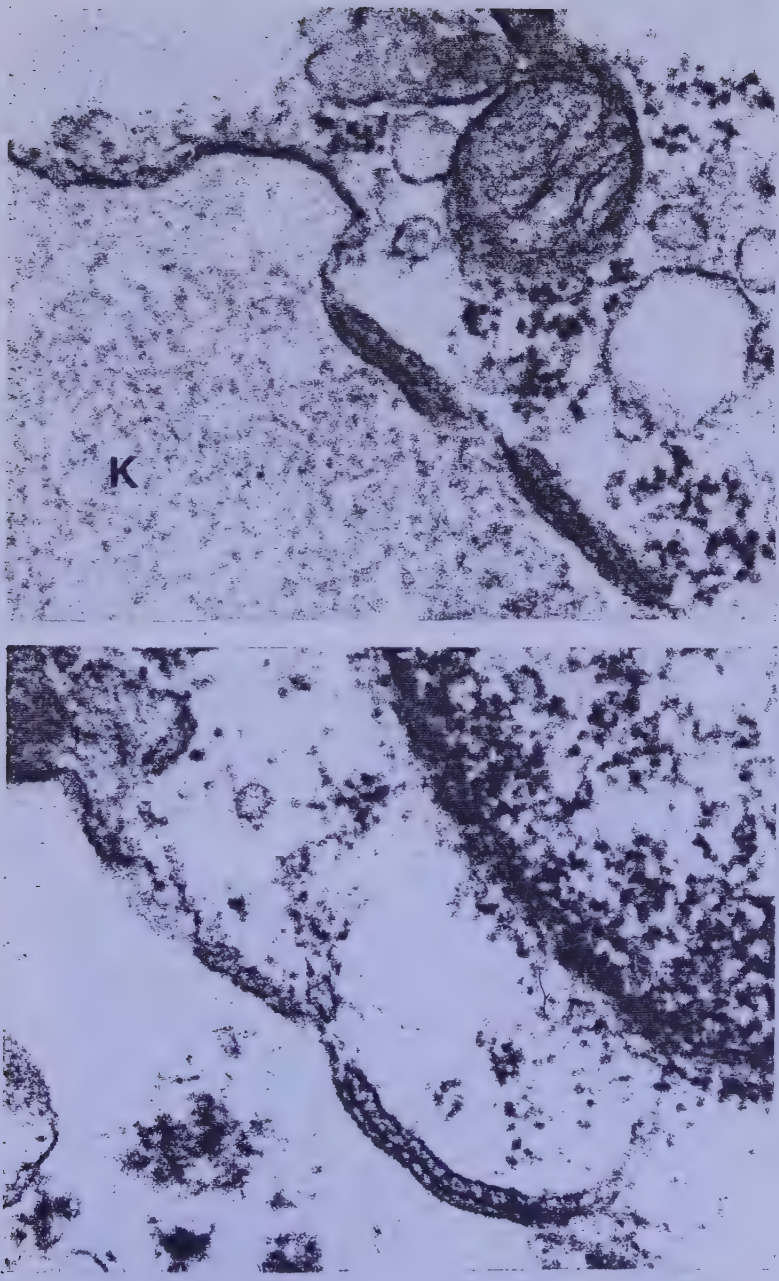
Abbildung 34 :

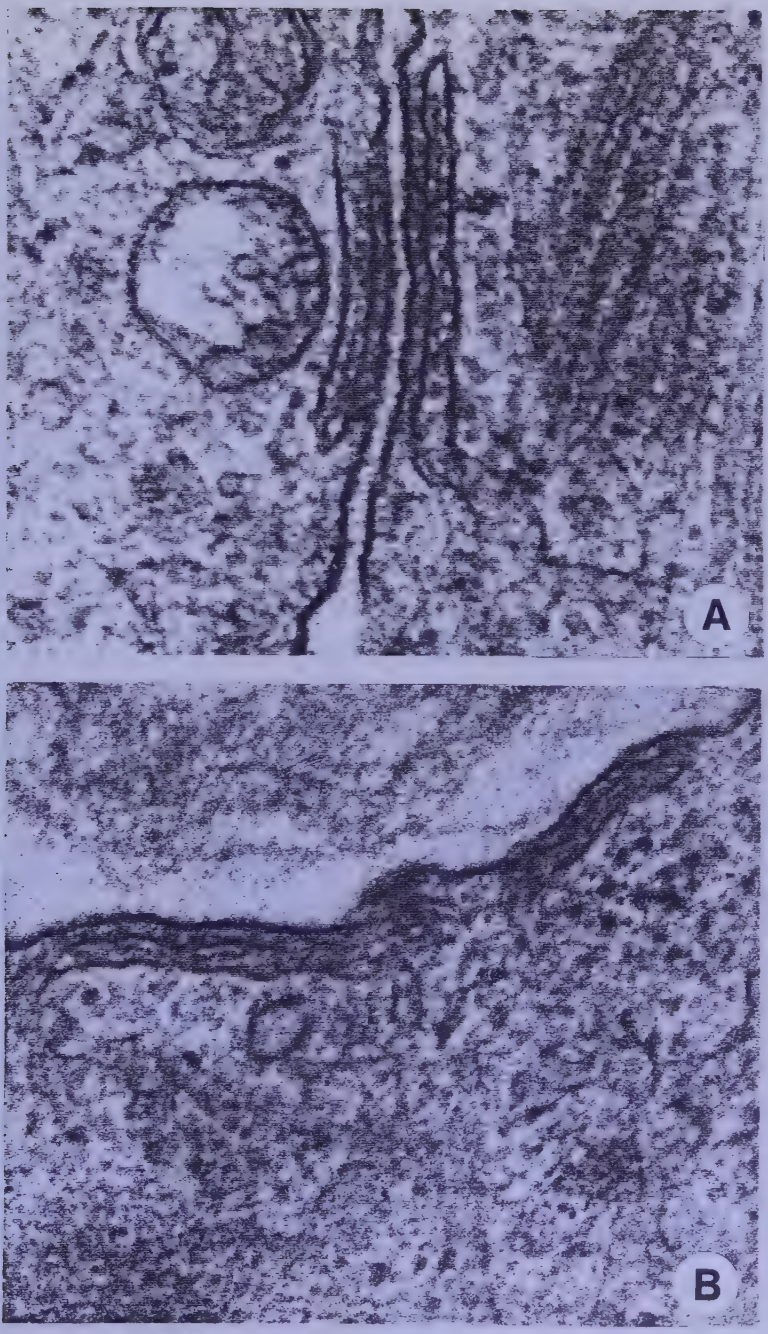
Gap junction in einem Myoblastenmonolayer.

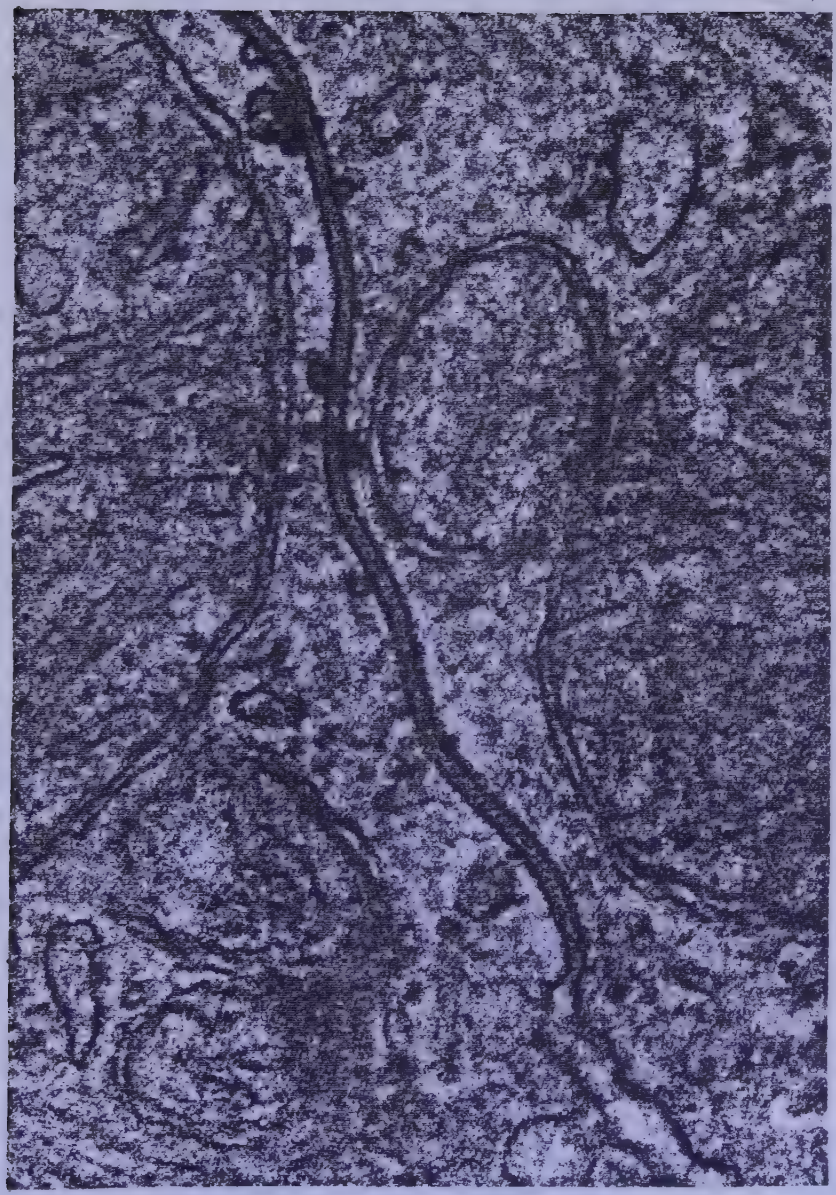
Abbildung 35 :

Einstreuung fibroblastenartiger Zellen in die Deckschicht eines Herzzellreaggregats.
Besonders auffällig ist die starke Ausbildung eines rauhen endoplasmatischen Retikulums mit oft großen runden Auftreibungen,so wie die Ausbildung von Lipidvesikeln,die sich sicher nicht aus Zerfallsprodukten von Mitochondrien herleiten,sondern Speicherlipide darstellen;Desmosomen fehlen.


V
P
T
O
I
D


K


A
B



K
35

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1 Agarwal, M.K., Philippe, M. (1979): Physical characterization of corticosteroid binders in adult rat heart.
J.Mol. Cell. Cardiol. 11, 115-126

2 Alt, J., Winter, P., Sebald, W., Moser, J.G., Schedel, R., Westhoff, P., Herrmann, R.G. (1983): Localization and nucleotide sequence of the gene for the ATP synthase proteolipid subunit on the spinach plastid chromosome.
Current Genetics 7, 129-138

3 Campbell, R.C. (1974): Statistics for Biologists.
2nd ed., Cambridge University Press: Cambridge-London-New York

4 Civerchia-Perez, L., Faris, B., La Pointe, G. (1980): Use of collagen-hydroxyethylmethacrylate hydrogels for cell growth.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77, 2064-2068

5 Clark jr. C.M., Allen, D.O., Clark, J.F. (1977): Appearances of responses to glucagon in cultured neonatal rat heart cells.
Endocrinology, 100, 989-993

6 Clark, J.M., Gebb, Ch., Hirtenstein, M.D.(1980): High yield microcarrier culture of animal cells in low-serum and serum-free media.
Eur. J. Cell. Biol. 22, 606

7 Clark, J.M., Hirtenstein, M., Gebb, C. (1980): Critical parameters in the microcarrier culture of animal cells.
Develop. Biol. Standards 46, 117-124

8 Clark, J.M. (1982): Microcarrier cell culture: Principles and methods.
Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala.

9 Crossin, F., Renaud, J.F., Le Douavin, G. (1978): Formation de disques intercalaires dans les agregats mixtes de cardiomyoblastes de caille et de poulet en culture in vitro. Biol. Cell. 33, 261-262

10 Eckel, J., Reinauer, H. (1980): Effect of vinblastine on the insulin-receptor interaction in mammalian heart muscle. Biochem. Biophys. Res. Comm. 92, 1403-1408

11 Edelman, G.M., Rutishauser, U. (1974): Specific fractionation and manipulation of cells with chemically derivatized fibers and surfaces.
In: Jacoby, W.B., Wilchek, M. (eds): Affinity techniques. Methods in Enzymology 34, 195-225, Academic Press: New York-San Francisco-London

12 Franke, W.W., Schmid, E., Grund, Chr., Müller, H., Engelbrecht, I., Moll, R., Stadler, J., Jarasch, E.D. (1981): Antibodies to high molecular weight polypeptides of desmosomes: specific localization of a class of junctional proteins in cells and tissues.
Differentiation 20, 217-241

13 Funder, J.J., Duval, D., Mayer, P. (1973): Cardiac glucocorticoid receptors: the binding of tritiated dexamethasone in rat and dog heart.
Endocrinology 93, 1300-1308

14 Goshima, K. (1970): Formation of Nexuses and Electronic Transmission between Myocardial and Fl-Cells in Monolayer Culture.
Exp. Cell Res. 63, 124-130

15 Goshima, K., Tonomura, J. (1969): Synchronized beating of Embryonic Mouse Myocardial Cells mediated by FL-Cells in Monolayer Culture.
Exp. Cell Res. 56, 387-392

16 Gros, D., Mocquard, J.P., Challice, C.E., Schrevel, J. (1979): Formation and growth of gap junctions in mouse myocardium during ontogenesis: Quantitative data and their implications on the development of intercellular communication.
J. Mol. Cell. Cardiol. 11, 543-554

17 DeHaan, R.L., Sachs, H.G. (1972): Cell coupling in developing systems: the heart cell paradigm.
Curr. Topics Dev. Biol. 7, 193-228

18 Halle, W. (1976): Zell- und Gewebezüchtung bei Tieren.
Bausteine der modernen Physiologie 3.
G. Fischer: Stuttgart-New York

19 Hirabayashi, T., Hayashi, Y. (1970): Studies on muscle differentiation I: Isolation and purification of structural proteins from leg muscles of the frog, Rana nigromaculata.
Dev. Growth Diff. 12, 89-107

20 Hirabayashi, R., Hayashi, Y. (1972): Studies on muscle differentiation V: Antigenicities of myosin and of actin from frog skeletal muscles.
Dev. Growth Diff. 14, 133-164

21 Hirtenstein, M., Clark, J., Lindgren, G. (1980): Microcarriers for animal cell culture: a brief review of theory and practice.
Develop. Biol. Standards 46, 109-116

22 Holtzer, H., Bennett, G.S., Tapscott, S.J., Croop, J.M., Toyama, Y. (1982): Intermediate-size filaments: Changes in synthesis and distribution in cells of myogenic and neurogenic lineages.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 46, 317-329

23 Horres, C.R., Lieberman, M., Purdy, J.E. (1977): Growth orientation of heart cells on nylon filament. J. Membrane Biol. 34, 313-329

24 John, J.Y., Crespi, C.L., Thilly, W.G. (1980): Selection of mitotic Chinese Hamster Ovary cells from microcarriers. Anal. Biochem. 109, 231-238

25 Josephson, J., Sperelakis, N. (1978): 5'-Guanylimidodiphosphate stimulation of slow Ca^{++} current in myocardial cells. J. Mol. Cell. Cardiol. 10, 1157-1166

26 Jourdon, P., Sperelakis, N. (1980): Electrical properties of cultured heart cell reaggregates from newborn rat ventricles: comparison with intact non-cultured ventricles. J. Mol. Cell. Cardiol. 12, 1441-1458

27 Kartenbeck, J., Franke, W.W., Moser, J.G., Stoffels, U. (1983): Specific attachment of desmin filaments to desmosomal plaques in cardiac myocytes. EMBO Journal 2, 735-742

28 Kaufmann, R., Tritthart, H. (1967): Registriereinrichtung zur gleichzeitigen Erfassung der mechanischen und elektrischen Aktivität einzelner Herzmuskelzellen aus Zellkulturen. Pflügers Archiv Ges. Physiol. 294, R2

29 Kaufmann, R., Tritthart, H., Rodenroth, S., Rost, B. (1969): Das mechanische und elektrische Verhalten isolierter embryonaler Herzmuskelzellen in Zellkulturen. Pflügers Arch. 311, 25-49

30 Kelly, A.M., Chako, S. (1976): Internal membrane junctions and unusual T-tubules in cultured chick cardiac muscle cells. J. Mol. Cell. Cardiol. 9, 419-424

31 Ketelsen, U.P., Freund-Mölbert, E., Struck, E. (1974): Zur Pathomorphologie der Corticoidmyopathie. Beitr. Pathol. 153, 133-164

32 Koch, G.L.E. (1980): The anchorage of cell surface receptors to the cytoskeleton. Int. Cell. Biol. 1980/81 p. 321-330

33 Koidl, B., Tritthart, H., Erkinger, S. (1980): Cultured embryonic chick heart cells: photometric measurement of the cell pulsation and the effects of calcium ions, electrical stimulation and temperature. J. Mol. Cell. Cardiol. 12, 165-178

34 van der Laarse, A., Hollaar, L., Kokshoven, L.J.M., Witteveen, S.A.G.J. (1979): The activity of cardio-specific isoenzymes of creatine phosphokinase and lactate dehydrogenase in monolayer cultures of neonatal rat heart cells. J. Mol. Cell. Cardiol. 11, 501-510

35 Lampidis, T.J., Moreno, G., Salet, C., Vinzens, F. (1979): Nuclear and mitochondrial effects of adriamycin in singly isolated pulsating myocardial cells. J. Mol. Cell. Cardiol. 11, 415-422

36 Lane, M.A., Sastre, A., Law, M., Salpeter, M.M. (1977): Cholinergic and adrenergic receptors on mouse cardiocytes in vitro. Devel. Biol. 57, 254-269

37 Lau, J.H., Caswell, A.H., Brunschwig, J.-P. (1977): Isolation of transverse tubules by fractionation of triad junctions of skeletal muscle. J. Biol. Chem. 252, 5565-5574

38 Lazarides, E. (1982): Intermediate filaments: A chemically heterogeneous, developmentally regulated class of proteins.
Ann. Rev. Biochem. 51, 219-250

39 Maroudas, N.G. (1976): Sulphonated polystyrene as an optimal substratum for the adhesion and spreading of mesenchymal cells in monovalent and divalent saline solutions.
J. Cell. Physiol. 90, 511-520

40 Masson-Pevet, M., Jongsma, H.J., de Bruijne, J. (1976): Collagenase- and trypsin-dissociated heart cells: a comparative ultrastructural study.
J. Mol. Cell. Cardiol. 8, 747-757

41 McCall, D. (1976): Effect of verapamil and of extracellular Ca and Na on contraction frequency of cultured heart cells.
J. Gen. Physiol. 68, 537-549

42 McNutt, N.S. (1970): Ultrastructure of intercellular junctions in adult and developing cardiac muscle.
Am. J. Cardiol. 25, 169-183

43 Meyer, R., David, H. (1980): Ultrastructural morphometric studies of cytoplasm of cultivated rat myocardial cells. A contribution to problems of cell differentiation in vitro.
Mikroskopie 37, 282-285

44 Mitchell, K.J., Wray, W. (1979): Mitotic cell populations obtained from a microcarrier culturing system.
Exp. Cell. Res. 123, 452-455

45 Moser, J.G., Wittmann, R., Brinkmann, U., Wagner, B. (1979): Suspension culture of myocardial cells from newborn rats.
Europ. J. Cell. Biol. 20, 168-173

46 Moser, J.G., Stoffels, U. (1983a): Differentiation of heart muscle cells from newborn rats on Cytodex 1 microcarriers. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., in Press

47 Moser, J.G., Stoffels, U., Straschewski, J., Kartenbeck, J. (1983b): Buoyant density, effective purification, and organotypic development of myoblasts from neonatal rat heart. Europ. J. Cell Biol., in Press

48 Moses, R.L., Kasten, F.H. (1979): T-tubes in cultured mammalian myocardial cells.
Cell Tissue Res. 203, 173-180

49 Muir, A.R. (1957): An electron-microscopic study of the embryology of the intercalated disc in the heart of the rabbit.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 3, 193-201

50 Naurath, H.J., Hettwer, H., Moser, J.G., Servos, G., Wagner, B. (1980): Qualitative und quantitative Bestimmung von Antikörpern gegen myofibrilläre Proteine.
Acta Histochem. Suppl. 21, 247-251

51 Paul, J.E. (1970): Cell and Tissue Culture.
4th Edition. Livingstone, E. and S.: Edinburgh.

52 Pawlowski, R., Krajcik, R., Loyd, R., Przybylski, R. (1979): Skeletal muscle development in culture on beaded microcarriers, Cytodex 1.
J. Cell Biol. 83, 115A

53 Perissel, B., Charbonné, F., Moalic, J.M., Malet, P. (1979): Initial stages of trypsinized cell culture of cardiac myoblasts: ultrastructural data
J. Mol. Cell Cardiol. 12, 63-75

54 Polinger, I. (1970): Separation of cell types in embryonic heart cell cultures.
Exp. Cell Res. 63, 78-82

55 Pretlow, J.G., Glick, M.R., Reddy, W.J. (1972): Separation of beating cardiac myocytes from suspensions of heart cells.
Am. J. Pathol. 67, 215-226

56 Reitzer, L.J., Will, B.M., Kennell, F. (1979): Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa-cells.
J. Biol. Chem. 254, 2669-2676

57 Renaud, J.F., Barhanin, J., Cavey, D., Fosset, M., Lazdunski, M. (1980): Comparative properties of the in ovo and in vitro differentiation of the muscarinic cholinergic receptor in embryonic heart cells.
Developm. Biol. 78, 184-200

58 Ross, M.R., Abbott, B.L. (1977): The effect of adriamycin on mammalian cardiac cells in tissue culture.
J. Mol. Cell Cardiol. 9, Suppl., 49

59 Sachs, H.G., DeHaan, R.L. (1973): Embryonic myocardial cell aggregates: volume and pulsation rate.
Developm. Biol. 30, 233-240

60 Sachs, F. (1976): Electrophysiological properties of tissues. Cultured heart cells grown in a linear array.
J. Membrane Biol. 28, 373-399

61 Schanne, O.F., Ruiz-Ceretti, E., Payet, M.D., Deslanriers, Y. (1979): Influence of varied $[Ca^{2+}]$ and $[Na^{+}]$ on electrical activity of clusters of cultured cardiac cells from neonatal rats.
J. Mol. Cell Cardiol. 11, 477-484

62 Schanne, O.F., Bkaily, G. (1981): Explanted cardiac cells: A model to study drug actions?
Can. J. Physiol. Pharmacol. 59, 443-467

63 Schmid, E., Osborn, M., Rungger-Brändle, E., Gabbiani, G., Weber, K., Franke, W.W. (1982): Distribution of vimentin and desmin filaments in smooth muscle and avian aorta.
Exp. Cell Res. 137, 329-340

64 Smith, M.A., Vale, W.W. (1980): Superfusion of rat anterior pituitary cells attached to Cytodex beads: Validation of a technique.
Endocrinology 107, 1425-1431

65 Sperelakis, N. (1978):
Cultured heart cell reaggregate model for studying cardiac toxicology.
Environmental Health Perspectives 26, 243-267

66 Vosbeck, K., Roth, S. (1976): Assay of intercellular adhesiveness using cell-coated Sephadex beads as collecting particles.
J. Cell Sci., 22, 657-670

67 Wallukat, G., Wollenberger, A. (1980): Differential alpha- and beta-adrenergic responsiveness of beating rat heart myocytes after stationary and non-stationary cultivation.
Acta Biol. Med. Germ. 39, K7-K13

68 van Wezel, A.L. (1967): Growth of cell strains and primary cells on microcarriers in homogeneous culture.
Nature 216, 64-65

69 van Wezel, A.L. (1973): Microcarrier cultures of animal cells.
In: Tissue culture: Methods and Applications. Kruse, P.F., Patterson, M.K. (eds), pp 372-377. Academic Press, New York

70 Williams, E.H., DeHaan, R.L. (1981): Electrical coupling among heart cells in the absence of ultrastructurally defined gap junctions.
J. Membr. Biol. 60, 237-248

71 Wittmann, R. (1977): Funktionelle Charakterisierung der ß-Adrenoceptoren kultivierter Herzmuskelzellen.
Diss. Düsseldorf

72 Wray, W., Mitchell, K. (1979): Mitotic cells obtained with micro-carriers.
J. Cell Biol. 83, 306A

73 Yaffe, D. (1969): Cellular aspects of muscle differentiation in vitro.
Current Topics in Developmental Biology 4,

74 Yaffe, D. (1973): Rat skeletal muscle cells.
In: Kruse, P.F., Patterson, M.K. (eds): Tissue culture: Methods and Applications. pp 106-114. Academic Press, New York

L E B E N S L A U F

21.2.1953	geboren als Tochter des Bankangestellten Heinrich Stoffels und seiner Ehefrau Josefine,geb. Speck.
1959 - 1964	Kath.Volksschule am Volmarweg,Düsseldorf
1964 - 1972	Städt. Luisengymnasium,Düsseldorf
1972 - 1977	Wertpapiersachbearbeiterin bei der Commerzbank AG,Düsseldorf
Oktober 1977	Immatrikulation im Studienfach Medizin an der Universität Düsseldorf
198o	Ärztliche Vorprüfung
1981	I. Staatsexamen
1983	II. Staatsexamen
1984	III. Staatsexamen
1.7.1984	Antritt einer Assistentenstelle im St. - Josef - Krankenhaus,Fachkrankenhaus für Neurologie und Psychiatrie,Neuß